

## Tesis de Posgrado

# Estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de fructanos en respuesta a estreses ambientales en Gramíneas nativas

Puebla, Andrea Fabiana

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Puebla, Andrea Fabiana. (1999). Estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de fructanos en respuesta a estreses ambientales en Gramíneas nativas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3102\\_Puebla.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3102_Puebla.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Puebla, Andrea Fabiana. "Estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de fructanos en respuesta a estreses ambientales en Gramíneas nativas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3102\\_Puebla.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3102_Puebla.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**FCE y N BIBLIOTECA**

**"Estudios bioquímicos y moleculares del  
metabolismo de fructanos en respuesta a estreses  
ambientales en Gramíneas nativas"**

**Lic. Andrea F. Puebla**

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Centro de Investigaciones Biológicas - F.I.B.A. - PROBIOP (CONICET)

Director: Dr. Horacio G. Pontis

1999

## **Agradecimiento especial**

Este trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas de la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas bajo la dirección conjunta del Dr Horacio G. Pontis y la Dra. Graciela L. Salerno. Lamentablemente la Dra. Salerno no ha sido reconocida como correspondería con la co-dirección formal de la presente Tesis, por lo que quiero expresar mi reconocimiento personal por la ayuda y la dedicación recibida.

## **Agradecimientos**

Durante todos estos años he tenido la inmensa fortuna de compartir momentos felices y otros menos reconfortantes con un montón de familiares, amigos y compañeros, que hicieron de este tiempo un período intenso de crecimiento. Con muchos de ellos tendré una eterna deuda que seguramente no podré saldar, pero he aquí una oportunidad para expresar lo rica que me siento por haberlos tenido cerca.

Agradezco:

- ❖ A mamá y a papá, por haberme guiado con amor y libertad, y por estar incondicionalmente dispuestos a compartir las alegrías y también las tristezas. También les quiero dar gracias por haber traído a Marcia al mundo, sin quien mi vida hubiese sido mucho menos feliz.
- ❖ A Marcia, por ser mi compañera inseparable y mi alegría constante. Por tener el don de sanarme de todos los males sin importar el motivo ni la distancia.
- ❖ Al resto de mi familia. A mis abuelos, tía y primos, por estar pendiente de lo que necesito y por haber llenado de amor todos estos años compartidos. A Gonzi, por renovarnos la íntima certeza de que la familia es la mayor riqueza que podemos tener.
- ❖ A Ro, por haberme enseñado lo incondicional que puede ser la amistad, más allá de diferencias y distancias.
- ❖ A mis amigas de siempre, Andrea y Valeria.
- ❖ A Carmiña por ser un ángel caído del cielo y Santa Patrona de los becarios abandonados por los buenos resultados.
- ❖ A mis compañeros del viejo laboratorio 5, con quienes aprendí que el trabajo puede tener mucho de compañerismo y diversión.
- ❖ A los FIBOs "viejos", Laura, Carlitos, Elsa, Marina, Bruni, Susi, Mimi, Nestor, Moncho, Leo, Andrea Po, Gaby, Diego, Patricia, Mariana, Corina, Fabiana y Clarita. A René y a Irene, a toda la nueva ola de FIBOs y a Jorge Tognetti por las discusiones divertidas sobre las verdades de la Ciencia y los buenos consejos.

- ❖ Al Dr. Pontis y a Graciela por toda la confianza y apoyo recibido durante estos años.
- ❖ A la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas, por darme la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral.
- ❖ A la buena gente de la cátedra de Microbiología, Agronomía, por haberme dado un lugar amigable donde trabajar en mi primera estadía en Bs. As..
- ❖ A Esteban Hopp por su ayuda desinteresada y a todos los nuevos compañeros del Instituto de Biotecnología del INTA de Castelar. A Mariana, Ana y Gaby por ayudarme con la tortuosa library.
- ❖ A los Paris por el cariño y la atención recibida.
- ❖ A todos los demás que poblaron estos años de trabajo y crecimiento y que seguro me olvido, en esta lista larga de deudas personales.
- ❖ A Gastón, por haberme confirmado que mis utopías pueden hacerse realidad y por haber llenado de luz todo lo que la vida me regaló.

# INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>Abreviaturas.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>Introducción.....</b>  | <b>14</b> |
| 1 - Respuestas a estreses abióticos en plantas superiores.....                            | 14        |
| 2 - Metabolismo de fructanos en plantas.....  | 17        |
| 2.1 Estructura molecular de los fructanos.....  | 17        |
| 2.2 Distribución de los fructanos en los distintos grupos taxonómicos.                    | 19        |
| 2.3 Ecología y evolución del metabolismo de fructanos en<br>plantas superiores.....       | 23        |
| 2.4 Enzimas del metabolismo de fructanos.....   | 26        |
| 1.4.1 El modelo de Edelman y Jefford: las enzimas de<br><i>Helianthus tuberosus</i> ..... | 26        |
| 1.4.2 Enzimas de fructanos en Gramíneas.....  | 30        |
| 2.5 Fisiología y compartimentalización del metabolismo de fructanos..                     | 32        |
| 2.6 Biología molecular del metabolismo de fructanos.....                                  | 34        |
| 3 - Metabolismo de sacarosa en plantas.....   | 36        |
| 4 - Especies nativas como modelo de estudio.....  | 40        |
| 5 - Objetivos .....   | 43        |
| <b>Materiales y Métodos.....</b>  | <b>45</b> |
| 1- Material biológico.....  | 45        |
| 1.1 Material vegetal.....   | 45        |
| 1.2 Cultivo de especies nativas en laboratorio.....                                       | 45        |
| 1.3 Cepas bacterianas.....  | 46        |
| 2 - Estreses ambientales.....   | 47        |
| 2.1 Tratamiento con bajas temperaturas.....   | 47        |
| 2.2 Tratamiento de déficit hídrico.....   | 47        |

|   |    |
|---|----|
| 2.3 Muestreo y conservación del material vegetal.....   | 48 |
| 3 - Extracción y análisis de azúcares solubles.....   | 49 |
| 3.1 Extracción.....   | 49 |
| 3.2 Análisis por métodos colorimétricos.....  | 49 |
| 3.3 Análisis por cromatografía en papel.....  | 49 |
| 3.4 Análisis por cromatografía en capa delgada.....   | 50 |
| 3.5 Análisis por cromatografía de exclusión molecular.....  | 50 |
| 3.6 Análisis por cromatografía de intercambio aniónico acoplada a<br>detección amperométrica de pulsos.....   | 50 |
| 4 - Extracción y análisis de proteínas solubles.....  | 51 |
| 4.1 Extracción y cuantificación de proteínas solubles.....  | 51 |
| 4.2 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....  | 52 |
| 4.3 Estudios de "Western blot".....   | 52 |
| 5 - Medición de actividades enzimáticas.....  | 53 |
| 5.1 Actividad de sacarosa-fosfato sintasa.....  | 53 |
| 5.2 Actividad de sacarosa sintasa.....  | 53 |
| 5.3 Actividad de invertasa ácida.....   | 53 |
| 5.4 Actividad de sacarosa-sacarosa fructosil transferasa.....   | 54 |
| 5.4.1 Método radiactivo acoplado a cromatografía en papel.....  | 54 |
| 5.4.2 Desarrollo de un método enzimático-colorimétrico.....   | 54 |
| 6 - Purificación parcial de la actividad sacarosa-sacarosa fructosil<br>transferasa de vástagos de plantas de <i>Bromus pictus</i> expuestas a bajas<br>temperaturas..... | 55 |
| 7 - Determinación de daño celular con reactivos fluorescentes.....  | 57 |
| 8 - Protocolos de técnicas básicas de biología molecular.....   | 58 |
| 9 - Extracción de ADN y ensayos tipo "southern".....  | 58 |
| 10 - Extracción de ARN y ensayos tipo "northern".....   | 59 |
| 11 - Construcción de una biblioteca de ADN copia en fagos.....  | 59 |
| 12 - Hibridación con sondas heterólogas de cebada.....  | 60 |
| 13 - Síntesis de ADNc de <i>Bromus pictus</i> para RT-PCR.....  | 60 |
| 14 - Reacción en cadena de la polimerasa .....  | 60 |



|   |           |
|---|-----------|
| 15 - Secuenciación y análisis de secuencias.....  | 61        |
| <b>Resultados.....</b>  | <b>63</b> |
| 1 – Análisis comparativo de la acumulación de azúcares en distintas especies de Gramíneas nativas sometidas a frío..... | 64        |
| 2 – Análisis de los fructo-oligosacáridos de las especies de <i>Bromus</i> .....  | 66        |
| 2.1 - Estrés por bajas temperaturas.....  | 66        |
| 2.2 - Estrés por déficit hídrico.....   | 83        |
| 3 – Análisis de las enzimas del metabolismo de sacarosa.....  | 91        |
| 3.1 - Estrés por frío.....  | 91        |
| 3.2 – Estrés por déficit hídrico.....   | 93        |
| 4 – Análisis del metabolismo de fructanos en plantas de <i>Bromus</i> sometidas a estrés por bajas temperaturas.....    | 94        |
| 5 – Estudios de viabilidad celular.....   | 97        |
| 6 – Estudios de la actividad SST de <i>Bromus pictus</i> .....  | 99        |
| 6.1 – Desarrollo de un método enzimático para el ensayo de la actividad SST.....  | 99        |
| 6.2 – Purificación de la actividad SST de <i>Bromus pictus</i> .....  | 103       |
| 6.3 – Características bioquímicas de la actividad SST de <i>Bromus pictus</i> .....                                     | 107       |
| 7 – Estudios moleculares de enzimas del metabolismo de fructanos.....   | 113       |
| 7.1 – Análisis moleculares con el ADNc de la 6-SFT de cebada.....   | 113       |
| 7.1.1 – Estudios de hibridación de ADN genómico.....  | 113       |
| 7.1.2 – Estudios de expresión.....  | 115       |
| 7.2 – Clonado por PCR de secuencias de fructosil transferasas.....  | 115       |
| 7.2.1 – Clonado por RT-PCR.....   | 115       |
| 7.2.2 – Secuencias genómicas de las especies de <i>Bromus</i> .....   | 120       |
| 7.3 – Biblioteca de ADN copia de <i>Bromus pictus</i> en fagos.....   | 120       |
| 7.4 – Secuenciación de clones positivos.....  | 122       |
| 7.5 – Análisis de secuencias.....   | 122       |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Discusión.....</b>  | <b>129</b> |
| 1 - Selección del modelo de estudio.....   | 129        |
| 2 - Estudios de tolerancia a estrés por bajas temperaturas en<br><i>Bromus auleticus</i> y <i>Bromus pictus</i> a través del metabolismo<br>de sacarosa y fructanos..... | 130        |
| 2.1 - Análisis de los fructo-oligosacáridos de las especies de <i>Bromus</i> ....  | 130        |
| 2.2 - Análisis de las enzimas del metabolismo de sacarosa.....   | 133        |
| 2.3 - Análisis del metabolismo de fructanos.....   | 135        |
| 3 - Estudios del metabolismo de sacarosa y fructanos en plantas de <i>Bromus</i><br><i>auleticus</i> y <i>Bromus pictus</i> sometidas a estrés hídrico.....              | 136        |
| 4 - Estudios de la actividad sacarosa-sacarosa fructosil transferasa en<br><i>Bromus pictus</i> .....  | 138        |
| 4.1 - Desarrollo de un método enzimático para el ensayo de la<br>actividad SST.....  | 138        |
| 4.2 - Purificación y medición de características bioquímicas de la<br>actividad SST de <i>Bromus pictus</i> .....  | 139        |
| 5 - Estudios moleculares de las enzimas del metabolismo de fructanos.....  | 143        |
| <b>Conclusiones.....</b>   | <b>147</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>152</b> |

# RESUMEN

Se ha estudiado la respuesta a estrés por bajas temperaturas y déficit hídrico en Gramíneas nativas de regiones con climas contrastantes de la Argentina. El modelo de trabajo se basó en el análisis comparativo del metabolismo de fructanos y sacarosa en relación con estreses abióticos en especies nativas de Patagonia y otras del mismo género adaptadas a regiones con climas más benignos. *Bromus pictus* y *Bromus auleticus*, se compararon como especies patagónicas y del centro y norte de Argentina, respectivamente. Se analizaron los azúcares que contienen fructosa en plantas control y tratadas. Se estudiaron los patrones de fructanos y se determinó la composición de oligosacáridos de ambas especies. Se estudiaron las enzimas del metabolismo de sacarosa y fructanos. Se midieron la actividad de las enzimas SPS, SS, INV y SST. La actividad SST mostró aumentos constantes frente al estrés por frío en la especie patagónica. Se desarrolló un nuevo método enzimático-colorimétrico para medir la actividad SST. Se estudiaron algunas propiedades bioquímicas de esta actividad parcialmente purificada de vástagos de *B. pictus* tratados a 4 °C. La actividad SST de *Bromus pictus* mostró un pH óptimo entre 5,5 y 6, no se saturó a altas concentraciones de sacarosa y mantuvo el 55% de la actividad a 30°C en incubaciones realizadas a 0°C. Se realizaron estudios de homología y expresión a partir de ácidos nucleicos de plantas de *B. pictus* tratadas con bajas temperaturas utilizando sondas heterólogas de la 6-SFT de cebada. Se demostró que en la especie patagónica hay secuencias homólogas de ADN y ARN a las existentes en cebada. Por la técnica de RT-PCR se clonó un fragmento de 760 pb del ADNc de *Bromus pictus* usando oligonucleótidos específicos en zonas altamente conservadas en otros genes de fructosil transferasas. La comparación de secuencias mostró una alta homología con la 6-SFT de cebada, con otras enzimas del metabolismo de fructanos de mono y dicotiledóneas y con INV ácidas de plantas.

# **ABSTRACT**

Low temperature and water stress treatments were assayed in plants of various species of Gramineae, belonging to different regions of Argentina. The experimental model was based in comparative studies of fructan and sucrose metabolism in relation with the abiotic stresses in native plants from Patagonia and other species of the same generous adapted to northern regions of Argentina with mild climatic conditions. *Bromus pictus* and *Bromus auleticus* were compared as patagonic and northern species respectively. Fructose-containing sugars were analysed. The fructan pool was studied and oligosaccharide composition was determined. Sucrose and fructan enzymes were studied. SPS, SS, INV and SST were assayed in control and treated plants in both *Bromus* species. Increasing levels of SST activity were observed in patagonic plants exposed to low temperature. A novel enzymatic-colorimetric method to assay SST activity was developed. Some biochemical properties of SST activity partially purified from shoots of *Bromus pictus* treated with low temperatures, were studied. SST activity of *Bromus pictus* has pH optimum between 5,5-6 , was non-saturated at high concentrations of sucrose and maintained high activity at 0°C. Southern and northern analysis were made with tissues of low temperature treated plants of *Bromus pictus*, using the ADNc of barley 6-SFT as a probe. *Bromus* sequences of DNA and RNA hybridised with the ADNc of barley. A ADNc fragment of *Bromus pictus* was cloned by RT-PCR using specific primers with high homology with plant fructosyltransferases. Sequence comparison has shown a high homology of the ADNc fragment with the ADNc of barley 6-SFT, other mono and dicotyledon fructan genes and acid invertases of plants.

## Abreviaturas

|                  |  |
|------------------|--|
| ADNc             | ADN copia.   |
| Aprox.           | Aproximadamente.   |
| ARNm             | ARN mensajero.   |
| CO <sub>2</sub>  | Dióxido de Carbono.  |
| D.E.             | Desviación Estándar  |
| FEH              | Fructan Exo Hidrolasa  |
| FFT              | Fructan-Fructan Fructosil Transferasa  |
| Fru              | Fructosa.  |
| Fru-6P           | Fructosa-6-Fosfato   |
| Gal              | Galactosa.   |
| GF               | Glucosa-Fructosa: Sacarosa.  |
| GFF              | Glucosa-Fructosa-Fructosa: Trisacárido.  |
| GFF <sub>n</sub> | Fructo-oligosacárido.  |
| 6G-FFT           | 6-Glucosa Fructan-Fructan Fructosil Transferasa  |
| Glc              | Glucosa.   |
| Glc-6P           | Glucosa-6-Fosfato.   |
| INV              | Invertasa Acida.   |
| HCl-Piridoxal    | Clorhidrato de Piridoxal.  |
| Hexosas-P        | Hexosas-Fosfato.   |
| HPAEC-PAD        | Cromatografía de Intercambio Aniónico Acoplada a<br>Detección Amperométrica de Pulsos. |
| pb               | Pares de Bases.  |
| PEG              | Polietilen Glicol.   |
| PF               | Peso Fresco  |
| Pi               | Fósforo Inorgánico.  |
| PI               | Punto Isoeléctrico.  |
| PM               | Peso Molecular.  |
| PS               | Peso Seco  |
| Triosas-P        | Triosas-Fosfato.   |

|          |  |
|----------|--|
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS. |
| 6-SFT    | 6-Sacarosa-Fructan Fructosil Transferasa                             |
| SPP      | Sacarosa-Fosfato Fosfatasa.  |
| SPS      | Sacarosa-Fosfato Sintasa.  |
| SS       | Sacarosa Sintasa.  |
| SST      | Sacarosa-Sacarosa Fructosil Transferasa                              |
| TLC      | Cromatografia en Capa Delgada.                                       |



# **INTRODUCCION**

## **INTRODUCCION**

### **1 - Respuestas a estreses abióticos en plantas superiores**

La radiación, la temperatura, el agua y los nutrientes son factores del medio ambiente que afectan el crecimiento y el desarrollo de las especies vegetales. La distribución de las plantas sobre la tierra depende, por lo tanto, de la existencia e intensidad de estos factores.

Levitt (1972, 1980) define a los estreses ambientales como cambios en las condiciones del medio que reducen o cambian desfavorablemente el crecimiento o desarrollo de las plantas.

Los estreses ambientales provocan en las plantas respuestas complejas y constituyen un problema fundamental para la agricultura ya que influyen sobre la supervivencia y la productividad de los cultivos. Estas respuestas se manifiestan a nivel celular, fisiológico y del desarrollo (Levitt, 1980) y son rasgos poligénicos, cuantitativos, controlados por un número de genes aditivos y probablemente sinérgicos (Bohnert y col., 1995). Se ha visto, por ejemplo, en estudios citogenéticos que diez de los veintiún pares cromosómicos en el trigo están envueltos en la respuesta a las bajas temperaturas (Sutka y Vesz, 1988).

Los genes inducidos bajo condiciones de estreses abióticos tales como las bajas temperaturas y la sequía, parecen codificar proteínas que tienen funciones de protección celular y transducción de señales, por ejemplo, proteínas constituyentes de canales de agua que alteran el potencial agua celular, enzimas requeridas para la síntesis de sustancias protectoras (azúcares, prolina y betaína), desaturasas lipídicas para modificar la composición de las membranas celulares, proteínas protectoras como las de tipo LEA (Late Embryogenesis Abundant), proteínas anticongelantes, chaperonas, proteínas que intervienen en la expresión de genes y la transducción de señales, proteasas y enzimas detoxificantes como la catalasa y la ascorbato peroxidasa (Shinozaki y Shamaguchi-Shinozaki, 1998).

Las especies de plantas que crecen en regiones templadas o frías sufren durante su ciclo de vida períodos de frío. Estas plantas deben ajustarse a fluctuaciones diarias y estacionales de temperatura. Frente a estos cambios responden en dos componentes principales: adaptación y aclimatación. La adaptación es una respuesta genómica a largo plazo, cuyas consecuencias son estables y permanecen en la población por generaciones. La aclimatación constituye una respuesta inducida por cambios ambientales que genera una alteración fenotípica sin cambios en el complemento genético (Huner y col., 1998).

La aclimatación a las bajas temperaturas constituye un conjunto de procesos bioquímicos y fisiológicos que se asocian a un incremento de la tolerancia al frío (Guy, 1990). Esta respuesta se genera a través de la exposición de las plantas a temperaturas bajas sobre cero (chilling) y es un proceso a largo plazo que incrementa la supervivencia a temperaturas bajo cero en las plantas tolerantes.

Dentro de las respuestas encontradas durante la aclimatación al frío se han descrito cambios en la composición lipídica de las membranas celulares (Hughes y Dunn, 1996), cambios en los patrones de proteínas solubles y de membrana (Guy, 1990), cambios en la composición isoenzimática de enzimas importantes en procesos celulares fundamentales, como la respiración y la fotosíntesis (Tomashow, 1990; Guy, 1990) y acumulación de solutos compatibles (sacarosa, rafinosa, prolina) (Chatterton y col., 1987; Suzuki, 1989; Tognetti y col., 1990; Santoiani y col., 1993; Delauney, 1993; Bachman y col., 1994, 1995).

La productividad de los ecosistemas terrestres está probablemente más limitada por la sequía que por cualquier otro factor ambiental. La disminución del potencial agua del medio provoca en las plantas detención del crecimiento, cierre de los estomas e inhibición de la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 1992).

Muchas de las respuestas bioquímicas observadas en frío también ocurren durante la exposición de las plantas a déficit hídrico ya que la formación de hielo extracelular durante la exposición a temperaturas bajo cero impone una fuerza deshidratadora a la solución no congelada intracelular. La formación de hielo lleva a una rápida concentración de los solutos extracelulares y el cambio de

potencial químico y osmótico provoca que el agua líquida se mueva hacia fuera de la célula (Guy, 1990).

Se ha observado la acumulación de solutos compatibles en células de plantas sometidas tanto a estrés por frío como por sequía. Varios autores han descrito la alteración bajo estas condiciones de los niveles de sacarosa y de polímeros relacionados, como los fructanos (Levitt, 1980; Calderón y Pontis, 1985; Hendry, 1987; Pressman y col., 1989; Hendry, 1993; Spollen y Nelson, 1994; Bachman y Keller, 1995; Pilon-Smits, 1995).

En muchas Gramíneas de climas templados se ha observado la acumulación de fructanos, polímeros de fructosa, cuando las plantas son expuestas a bajas temperaturas sobre cero. El incremento en el contenido de estos polímeros de fructosa puede estar relacionado al proceso de aclimatación a bajas temperaturas (Pontis, 1989; Tognetti y col., 1989; Santoiani y col. 1993; Equiza y col., 1997) o puede ser consecuencia de una baja demanda de fotosintatos durante estas condiciones (Pollock, 1984), sin excluir que ambos puedan estar sucediendo simultáneamente.

## **2 - Metabolismo de fructanos en plantas**

El almidón es el hidrato de carbono de reserva más frecuentemente hallado entre las plantas vasculares y puede acumularse tanto en los plástidos de las hojas como en órganos especializados (Preiss y Levi, 1980). Sin embargo un número elevado de plantas acumulan otras formas de azúcares solubles de reserva: la sacarosa, los fructanos y los polímeros derivados de la rafinosa son los hidratos de carbono alternativos más distribuidos entre grupos importantes de plantas vasculares.

### **2.1 - Estructura molecular de los fructanos**

Los fructanos son polímeros de fructosa. Se sintetizan a partir de sacarosa por adición de fructosilos, por lo que contienen un residuo de glucosa en cada molécula (Kandler y Hopf, 1980).

Es uno de los pocos polímeros naturales que contienen los monosacáridos en forma de furanosa. Ningún carbono del anillo furanoso de las fructosas que componen los fructanos forman parte de su esqueleto macromolecular, lo que le confiere gran flexibilidad a toda la molécula, cumpliendo un rol importante en la conformación final de las moléculas en solución (Marchessault y col., 1980).

Los fructanos provenientes de varias especies vegetales consisten en series homólogas de oligosacáridos no reductores, altamente solubles que contienen un residuo de fructosa más que el miembro anterior de la serie (Edelman y Jefford, 1968). Estos azúcares difieren en su estructura y pesos moleculares según el grupo taxonómico al cual pertenecen y se han propuesto como característica importante en la clasificación de grupos taxonómicos en Gramíneas (Chatterton y col., 1989; Cairns y Ashton, 1993; Bonnet y col., 1997).

Según sus características estructurales existen tres tipos de fructosilsacarosa, primer miembro de la serie de fructanos a partir del cual se los ha clasificado en tres grupos principales:

## **2 - Metabolismo de fructanos en plantas**

El almidón es el hidrato de carbono de reserva más frecuentemente hallado entre las plantas vasculares y puede acumularse tanto en los plástidos de las hojas como en órganos especializados (Preiss y Levi, 1980). Sin embargo un número elevado de plantas acumulan otras formas de azúcares solubles de reserva: la sacarosa, los fructanos y los polímeros derivados de la rafinosa son los hidratos de carbono alternativos más distribuidos entre grupos importantes de plantas vasculares.

### **2.1 - Estructura molecular de los fructanos**

Los fructanos son polímeros de fructosa. Se sintetizan a partir de sacarosa por adición de fructosilos, por lo que contienen un residuo de glucosa en cada molécula (Kandler y Hopf, 1980).

Es uno de los pocos polímeros naturales que contienen los monosacáridos en forma de furanosa. Ningún carbono del anillo furanoso de las fructosas que componen los fructanos forman parte de su esqueleto macromolecular, lo que le confiere gran flexibilidad a toda la molécula, cumpliendo un rol importante en la conformación final de las moléculas en solución (Marchessault y col., 1980).

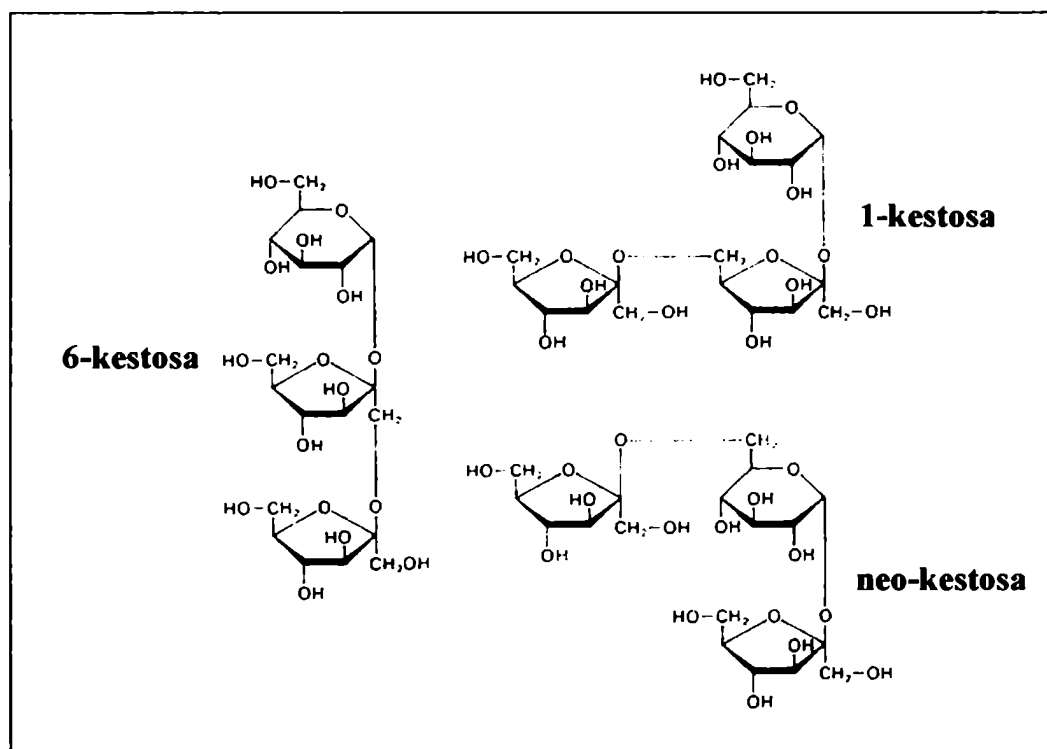
Los fructanos provenientes de varias especies vegetales consisten en series homólogas de oligosacáridos no reductores, altamente solubles que contienen un residuo de fructosa más que el miembro anterior de la serie (Edelman y Jefford, 1968). Estos azúcares difieren en su estructura y pesos moleculares según el grupo taxonómico al cual pertenecen y se han propuesto como característica importante en la clasificación de grupos taxonómicos en Gramíneas (Chatterton y col., 1989; Cairns y Ashton, 1993; Bonnet y col., 1997).

Según sus características estructurales existen tres tipos de fructosilsacarosa, primer miembro de la serie de fructanos a partir del cual se los ha clasificado en tres grupos principales:

1) Serie de la 1-kestosa: derivado del trisacárido que le da nombre y consiste en cadenas de fructosas unidas por enlaces  $\beta$ -2,1. La 1-kestosa parece ser ubicua en todas las especies que contienen fructanos (Wagner y Wienken, 1987)

2) Serie de la 6-kestosa: polímeros conteniendo residuos de fructosa unidos por enlaces  $\beta$ -2,6.

3) Serie de la neo-kestosa: tercer trisacárido que difiere de los otros dos en que la molécula de glucosa no es terminal, sino que se encuentra directamente ligada a dos unidades de fructosa a través de sus carbonos 1 y 6. La serie luego se extiende por enlaces entre fructosas de tipo  $\beta$ -2,1 ó  $\beta$ -2,6.



**Figura 1:** Estructura molecular de los isómeros de trisacárido de fructanos de plantas.

Muchos grupos de plantas poseen fructanos de una sola de las series descriptas, pero también existen oligosacáridos conteniendo azúcares con distintos tipos de uniones, como es el caso de la mayor parte de las Gramíneas.

Recientemente se ha propuesto una nueva nomenclatura para facilitar el reconocimiento de los distintos fructo-oligosacáridos con sus uniones características (Lewis, 1993). Su uso ha sido importante en los estudios de estructura molecular de los fructanos de Gramíneas.

## **2.2 - Distribución de los fructanos en los distintos grupos taxonómicos**

Los fructanos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y en otros grupos taxonómicos. Están presentes no solamente en las Angiospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas, sino también en algas verdes, musgos, cianobacterias, hongos y bacterias no fotosintéticas (Tsusúé, 1964; Hendry y Wallance, 1993).

Las especies vegetales que contienen fructanos constituyen el 15% de la flora angiosperma contemporánea (Tabla 1).



**Tabla 1: Distribución del metabolismo de fructanos en las familias de angiospermas más importantes, estimación del número de especies y localización geográfica**

| Orden                   | Familias principales                                 | Nº de sp. estimado | Regiones   |
|-------------------------|--|--------------------|--|
| <b>Monocotiledóneas</b> |  |                    |  |
| Poales                  | Poaceae (subflía. Pooideae)                          | 1200               | Templado fría/cálida   |
| Liliales                | Haemodoraceae<br>Liliaceae<br>Iridaceae<br>Agavaceae | 6.300              | Subtropical/Tropical<br>Cosmopolita<br>Cosmopolita<br>Semiárida/Tropical |
| <b>Dicotiledóneas</b>   |  |                    |  |
| Asterales               | Compositae   | 25.000             | Cosmopolita  |
| Campanulales            | Campanulaceae<br>Stylidaceae<br>Goodenaceae          | 2.500              | Templada (norte)<br>Semiárida<br>Semiárida                               |
| Polemoniales            | Boraginaceae   | 2.000              | Templada/Subtropical   |

Extraído de Hendry y Wallace (1993).

Teniendo en cuenta la clasificación de los fructanos según su estructura, las Compuestas, Boragináceas e Iridáceas (Kandler y Hopf, 1980) contienen fructanos de la serie de la 1-kestosa, también llamadas inulinas. Las inulinas han sido ampliamente estudiadas en *Helianthus tuberosus*, donde aparecen como polímeros lineales de hasta 35 residuos de fructosa (Haworth and Learner, 1928; McDonald, 1946; Edelman y Jefford, 1968). Recientemente Ernst y col. (1996) han detectado en Compuestas la existencia de inulinas que no poseen glucosa terminal.

En el grupo de las fleínas (serie de la 6-kestosa) se encuentran varias especies de Pooideas, entre las cuales *Phleum pratense* ha sido la más estudiada, encontrándose fructanos con pesos moleculares mayores a 50 kDa. A este tipo de fructanos también pertenecen los fructanos hallados en bacterias, pero el tamaño encontrado en estos microorganismos supera ampliamente los hallados en plantas, llegando a 3 MDa (Dedonder, 1972).

La serie de la neo-kestosa está representada en *Leucojum sp.* (Hammer, 1970), *Allium cepa* y *Asparagus officinalis* (Shiomi y col., 1976, 1979; Shiomi, 1981), especies que tienen neo-series con enlaces  $\beta$ -2,1, y en *Avena* con polímeros cuyas fructosas están unidas en enlaces tipo  $\beta$ -2,6 (Livingston y col., 1993).

La mayor parte de estos órdenes es considerada altamente evolucionada, con excepción de las Liliales, grupo todavía poco definido como unidad taxonómica y posición evolutiva (Hendry, 1987). Varios de estos grupos también contienen especies de importancia agrícola, tal es el caso de las Poales (cereales y pasturas de climas templados) y las Liliales (cebolla, ajo), en el caso de las monocotiledóneas y las Asterales (*Dahlia*, achicoria y topinambur o alcaucil de Jerusalem) entre las dicotiledóneas.

Los fructanos están distribuidos ampliamente entre las Gramíneas, pero concentrados particularmente en las tribus Triticeae, Poaceae, Bromaeae y Avenae (Hendry y Wallance, 1993). Estos polímeros de fructosa se acumulan en las Gramíneas de climas templados durante el descenso de temperatura en el otoño y se ha sugerido su asociación con la aclimatación de estas especies a las bajas temperaturas (Okajima y Smith, 1964, Pontis y Del Campillo, 1985).

Varios estudios sugieren que en Gramíneas los fructanos están restringidos a las especies  $C_3$  o Gramíneas de estación fría, aunque no todas las Gramíneas  $C_3$  contienen fructanos (Bender y Smith, 1973; Smith, 1968; Smith, 1973; Chatterton y col, 1989, Pollock y Cairns, 1991).

Chatterton y col. (1989), observaron en un estudio de 185 variedades de Gramíneas que los fructanos estaban ausentes en las especies  $C_4$  (o estaban presentes en muy baja concentración), pero tampoco se encontraron en los géneros *Stipa*, *Danthonia*, *Oryzopsis* y *Phragmites*, plantas  $C_3$  aceptadas como

de origen Gondwanico (Barkworth, M.E. y Everett, J., 1986; Concert, 1986). Este trabajo también demuestra que el almidón y los fructanos no son necesariamente formas alternativas de hidratos de carbono de reserva y que la acumulación de fructanos no está asociada a un alto contenido de sacarosa en las especies de Gramíneas estudiadas.

Los fructanos de la mayoría de las Gramíneas pertenecen al grupo de los fructanos ramificados, conteniendo los dos tipos de uniones  $\beta$ -2,1 y  $\beta$ -2,6. Estimaciones del tamaño molecular de estos polímeros difieren ostensiblemente entre las especies estudiadas, teniendo entre 5 y 50 kDa. Los fructanos extraídos de *Festuca pratensis* y *Bromus inermis* tienen un peso molecular aproximado de 12 y 5 kDa respectivamente (Pollock y Chatterton, 1988).

En los últimos años, la disponibilidad de técnicas rápidas y efectivas en la separación de los oligosacáridos de Gramíneas ha permitido la dilucidación de la composición de fructanos de varias especies y han puesto en evidencia la complejidad de los patrones de unión de estos azúcares.

### **2.3 - Ecología y evolución del metabolismo de fructanos en plantas superiores**

La aparición del metabolismo de fructanos entre grupos de plantas superiores es relativamente reciente (Hendry, 1993). La enorme distancia evolutiva entre los taxa que contienen fructanos, junto con evidencias de la aparición de este metabolismo en grupos aislados de plantas inferiores, hongos y bacterias (ver distribución de los fructanos en los distintos grupos taxonómicos), apoya la idea de un origen polifilético de los genes del metabolismo de fructanos (Hendry, 1993; Hendry y Wallace, 1993).

La presencia de fructanos en las familias Poaceae y Asteraceae, grupos de plantas considerados recientemente evolucionados, ha llevado a numerosos investigadores a preguntarse cuál es el significado evolutivo de la aparición del metabolismo de fructanos en plantas superiores.

Las presiones selectivas que dieron lugar a la aparición de los genes de síntesis de fructanos son desconocidas y no hay datos confiables en cuanto a los centros biogeográficos en donde las familias de plantas que sintetizan fructanos se originaron (Hendry y Wallace, 1993).

Varios trabajos han asociado la presencia del metabolismo de fructanos en Gramíneas de climas templados con la tolerancia a las bajas temperaturas (Levitt, 1980; Calderón y Pontis, 1985; Hendry, 1987; Pressman y col., 1989; Hendry, 1993; Spollen y Nelson, 1994; Tognetti y col., 1989; Santoiani y col., 1993; Puebla y col., 1997; Equiza y col., 1997), aunque no hay evidencia de que las plantas vasculares que contienen fructanos habiten zonas frías del mundo (Hendry, 1993).

Se podría hacer una aproximación relacionando las características climatológicas que imperaban en los períodos geológicos en los cuales aparecieron las plantas con fructanos (Tabla 2).

**Tabla 2: Primera evidencia fósil de los órdenes de Angiospermas conocidos en la actualidad que incluyen familias con fructanos.**

| <b>Millones de años atrás</b> | <b>Período/Epoca</b>      | <b>Orden</b>  |
|-------------------------------|---------------------------|---|
| 24-5                          | Mioceno                   | Asterales (mayoría de las familias)<br>Poales (mayoría de las familias)<br>Polemoniales (Menyanthaceae)             |
| 32-25                         | Oligoceno                 | Campanulales (Goodeniales)<br>Asterales (pocas)<br>Polemoniales (Boraginaceae)<br>Poales – sp. pobres en fructanos? |
| 55-33                         | Eoceno                    | Dipsacales<br>Liliales (mayoría de las familias)  |
| 64-56                         | Paleoceno                 | Poales? Polen<br>Liliales (Agavaceae?)  |
| 73-65                         | Cretáceo (Maastriciano)   | Liliales (Liliaceae, Smilacaceae)<br>Ericales (Cletraceae?)   |
| 125                           | Cretáceo (Barremiano)     | Pollen de Angiospermas  |
| 135                           | Cretáceo temprano y antes | Primeras Angiospermas   |

Extraído de Hendry y Wallace (1993)

Los períodos Eoceno, Oligoceno y Mioceno de la Era Terciaria cubren el tiempo de evolución del metabolismo de fructanos en plantas superiores. Durante estos períodos los elementos climáticos más marcados son la sequía y la estacionalidad, por lo que parecería razonable hipotetizar que la disponibilidad de agua combinada con la estacionalidad fue una poderosa fuerza de selección y evolución para los genes de la síntesis de fructanos.

A pesar de que la distribución geográfica actual de las familias que contienen fructanos es muy distinta a la original, hay evidencias actuales que apoyan que el déficit hídrico es un factor importante:

- El grupo de las Pooideas se distribuye en la actualidad mayoritariamente en zonas templado-secas o templado-frías.
- Las Liliales en zonas tropicales con estación seca.
- Las Asterales son cosmopolitas, pero están ampliamente distribuidas en regiones semi-áridas.

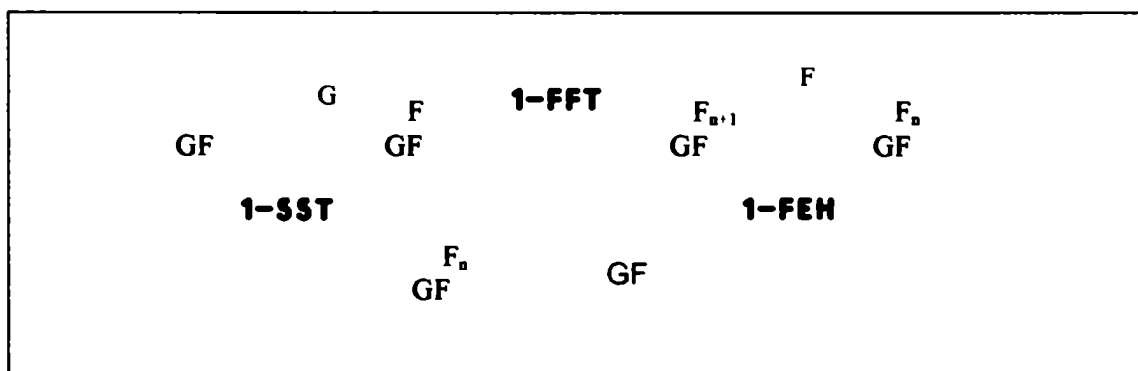
Con excepciones inevitables, la flora que contiene fructanos parece ser más rica en regiones y ecosistemas donde hay patrones de disponibilidad estacional de agua. La asociación de los fructanos con el frío, en este sentido, es mucho menos aparente (Hendry y Wallace, 1993).

## 2.4 - Enzimas del metabolismo de fructanos

### 1.4.1 El modelo de Edelman y Jefford: las enzimas de *Helianthus tuberosus*

Está ampliamente aceptado que la biosíntesis de fructanos en plantas superiores ocurre con sacarosa como único sustrato (Pollock, 1984). Edelman y col. en la década del 60 aportaron el primer modelo de la vía de síntesis de fructanos en plantas, describiendo tres enzimas asociadas con el metabolismo de fructanos en *Helianthus tuberosus* (Figura 2):

- 1) **Sacarosa sacarosa fructosil transferasa (SST)** (Scott y col., 1966), que sintetiza 1-kestosa a partir de dos moléculas de sacarosa, liberando glucosa.
- 2) **Fructan fructan fructosil transferasa (FFT)** (Edelman y col, 1960), que redistribuye los fructosilos transfiriéndolos de un oligosacárido a otro o cediéndoselo a la sacarosa.
- 3) **Fructan exohidrolasa (FEH)** (Edelman y Jefford, 1968), que hidroliza las fructosas terminales de los fructanos.



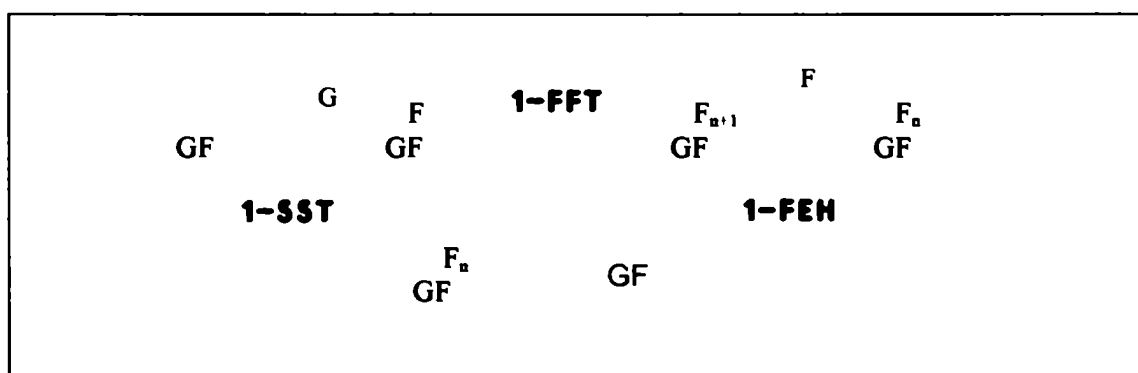
**Figura 2:** Modelo de Edelman y Jefford de síntesis y degradación de fructanos en *Helianthus tuberosus*.

## 2.4 - Enzimas del metabolismo de fructanos

### 1.4.1 El modelo de Edelman y Jefford: las enzimas de *Helianthus tuberosus*

Está ampliamente aceptado que la biosíntesis de fructanos en plantas superiores ocurre con sacarosa como único sustrato (Pollock, 1984). Edelman y col. en la década del 60 aportaron el primer modelo de la vía de síntesis de fructanos en plantas, describiendo tres enzimas asociadas con el metabolismo de fructanos en *Helianthus tuberosus* (Figura 2):

- 1) **Sacarosa sacarosa fructosil transferasa (SST)** (Scott y col., 1966), que sintetiza 1-kestosa a partir de dos moléculas de sacarosa, liberando glucosa.
- 2) **Fructan fructan fructosil transferasa (FFT)** (Edelman y col, 1960), que redistribuye los fructosilos transfiriéndolos de un oligosacárido a otro o cediéndoselo a la sacarosa.
- 3) **Fructan exohidrolasa (FEH)** (Edelman y Jefford, 1968), que hidroliza las fructosas terminales de los fructanos.



**Figura 2:** Modelo de Edelman y Jefford de síntesis y degradación de fructanos en *Helianthus tuberosus*.



En este modelo la SST es la única actividad enzimática que incrementa el número de enlaces Fru-Fru, mientras que la FFT redistribuye los residuos de fructosa aumentando o disminuyendo el tamaño de los oligosacáridos.

Todas estas enzimas producen o hidrolizan enlaces  $\beta$ -2,1, característicos de los fructanos de Compuestas.

Varios autores han sugerido la existencia de una vía alternativa para la síntesis de fructanos, basados en la presencia en algunas especies vegetales de nucleótidos-azúcar conteniendo fructosa que podrían actuar como dadores de fructosilos (Pontis, 1995), pero hasta el presente esta hipótesis no ha sido confirmada.

A partir de los trabajos pioneros de Edelman y Jefford, las actividades de las enzimas de fructanos han sido ensayadas en una amplia variedad de especies, intentándose exhaustivamente la purificación de las tres enzimas componentes de este modelo (Tabla 3):

**Tabla 3: Estudios de enzimas del metabolismo de fructanos en distintas especies de plantas superiores**

| Enzima | Especie   | Citas  |
|--------|---|--|
| SST    | Cebolla<br>Achicoria<br>Lechuga<br>Dahlia<br>Diente de León<br>Agave<br>Espárrago<br>Cebada<br><i>Agropyron</i><br>Trigo  | Scott, 1968; Shiomi, 1980.<br>Singh, 1971; Gupta, 1985.<br>Chandorkar, 1974.<br>Srepe, 1975.<br>Srepe, 1975.<br>Satyanarayana, 1976.<br>Shiomi, 1980,1989.<br>Wagner, 1983, Wang, 1996.<br>Chatterton, 1988.<br>Housley, 1989. |
| FFT    | Espárrago<br>Trigo<br>Topinambur<br>Diente de León  | Shiomi, 1981,1982, 1989.<br>Jeong, 1992.<br>Lüscher, 1993<br>Lüscher, 1993   |
| FEH    | Diente de León<br><i>Festuca arundinaceae</i><br><i>Phleum pratense</i><br><i>Dactylis glomerata</i><br>Cebada<br>Trigo<br><i>Lolium perenne</i><br><i>Avena sativa</i> | Rutherford, 1972.<br>Smith, 1976.<br>Mino, 1976.<br>Yamamoto, 1985<br>Wagner, 1986; Henson, 1989.<br>Bancal, 1991.<br>Simpson, 1993 (revisión).<br>Henson, 1996.   |

Muchos de los trabajos publicados sobre purificación parcial y medición en extractos crudos de estas enzimas fueron duramente criticados (Cairns y Ashton, 1991; Cairns, 1993). Cairns y col. proponen que la medición de la actividad SST en extractos crudos o parcialmente puros, se encuentra modificada por la presencia de INV, que compite por el sustrato, degrada fructanos de bajo peso molecular y es capaz de sintetizar oligosacáridos de bajo GP, en las condiciones usuales de concentración de sacarosa en las cuales se mide la actividad SST.

No fue hasta mediados de la década del 90 que se logró la purificación a homogeneidad de algunas de las enzimas del metabolismo de fructanos y con esto, la posibilidad de corroborar el modelo de síntesis de estos azúcares.

Las enzimas purificadas del metabolismo de fructanos en Compuestas validaron el modelo de Edelman y Jefford. Se caracterizaron las propiedades bioquímicas de las enzimas 1-SST y 1-FFT de *Helianthus tuberosus* y *Cichorium intybus* (Koops y Jonker, 1994, 1996; Van den Ende y col., 1996; Lüscher y col., 1996) (Tabla 4).

#### ❖ **Propiedades de las FEH**

La FEH de Compuestas no ha sido purificada a homogeneidad ni se conocen aún sus propiedades bioquímicas, pero ha sido estudiada exhaustivamente en otras especies (ver citas anteriores). En Gramíneas, el PM aparente está entre 57-68 kDa. Su actividad máxima se observa en pH 5,5-6. Se han descrito isoformas de FEH que difieren en su pI ácido (revisión de Simpson y Bonnett, 1993).

**Tabla 4: Propiedades bioquímicas de la 1-SST y 1-FFT purificadas a homogeneidad de *Helianthus tuberosus* y *Cichorium intybus***

| Propiedades                         | 1-SST  |                   | 1-FFT              |                   |
|-------------------------------------|--|-------------------|--------------------|-------------------|
|                                     | <i>H.tuberosus</i>                                     | <i>C.intybus</i>  | <i>H.tuberosus</i> | <i>C.intybus</i>  |
| PM (geles nativos)                  | 90 kDa   | 69 kDa            | 67 kDa             | 69 kDa            |
| Subunidades (SDS-PAGE)              | 2  | 2                 | 1                  | 2                 |
| PM (subunidades)                    | 27 y 55 kDa  | 24 y 49 kDa       | 67 kDa             | 17 y 52 kDa       |
| Isoformas (por pI)                  | sí   | sí                | sí                 | sí                |
| pH óptimo                           | 3,5-5  | 5-5,5             | 5,5-7              | 5,5-6,5           |
| Incubación a bajas temp.<br>(0-5°C) | Alta<br>actividad                                      | Alta<br>actividad | Alta<br>actividad  | Alta<br>actividad |
| Conc. saturante de sacarosa         | 900 mM   | 800 mM            | -                  | -                 |
| Inhibición por sacarosa             | no   | no                | sí                 | sí                |
| Secuencia de aa                     | Homólogas con otras enzimas de fructanos e INV ácidas. |                   |                    |                   |

Todas las enzimas del metabolismo de fructanos de plantas parecen estar glicosiladas, por su afinidad con Concanavalina A. En todas las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de genes clonados, existen secuencias concenso de glicosilación (Asn X Ser/Thr) (Sprenger y col., 1995; Hellwege y col., 1997; Vijn y col., 1997,1998; Rehn y col. 1998; van der Meer y col., 1998). Rehn y col. demostraron en *Aspergillus foetidus*, que el tamaño observado en SDS-PAGE de la 1-SST se modificaba drásticamente luego de tratar con glicosidasas, pasando de 90 á 60 kDa. Estos datos apoyan la hipótesis de que las enzimas de fructanos son glicoproteínas.

Además de la purificación a homogeneidad y la caracterización de estas enzimas, se ha podido lograr la síntesis *in vitro* a partir de sacarosa de los fructanos de especies de Compuestas y confirmar que el patrón de azúcares logrado coincide con el encontrado *in vivo*, logrando con esto confirmar el modelo de Edelman y Jefford como ruta de síntesis de fructanos en estas especies (Van den Ende y col. 1996; Lüscher y col., 1996).

#### 1.4.2 Enzimas de fructanos en Gramíneas

El modelo de Edelman y Jefford no alcanza para explicar el metabolismo de fructanos en Gramíneas y otras especies en donde se detecta una mayor diversidad de estructura de estos polisacáridos.

La existencia de fructanos con uniones  $\beta$ -2,6 y derivados de la serie de la neokestosa obligaron a los investigadores a teorizar sobre la existencia de otras enzimas que pudieran explicar el complejo patrón de azúcares encontrados *in vivo* en otras especies. A partir de estas hipótesis, fueron encontradas y caracterizadas otras actividades enzimáticas no incluidas en el modelo (Shiomi, 1989).

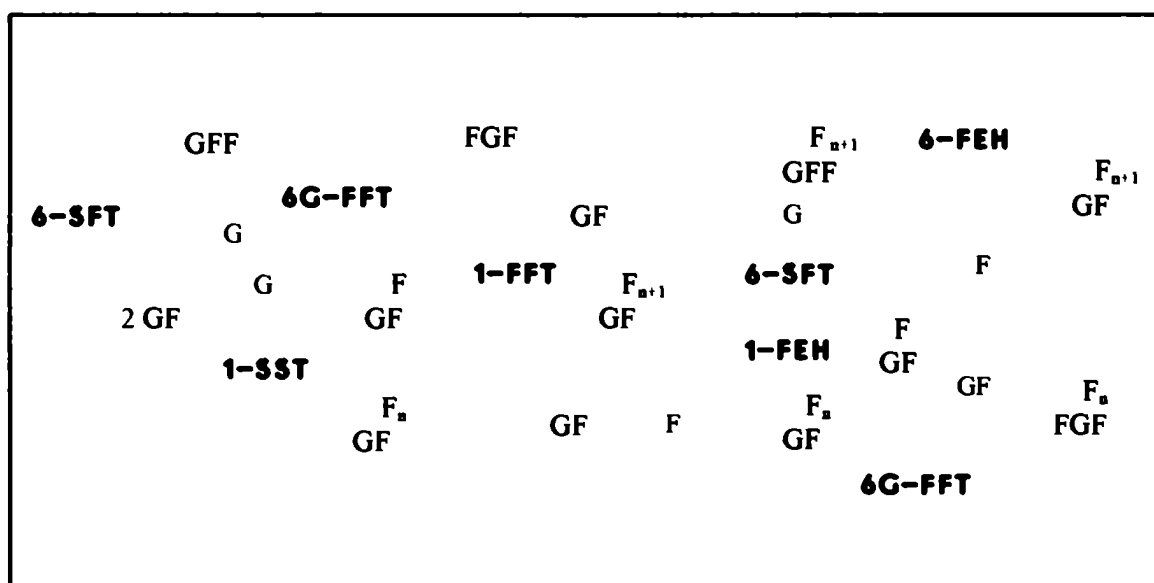
Para las Gramíneas en particular, se había propuesto la existencia de una 6-SST que sintetizaría 6-kestosa (trisacárido ampliamente difundido en los patrones de fructanos de muchas de estas especies), de una 6-FFT, que fuera capaz de redistribuir los residuos de fructosa en uniones  $\beta$ -2,6 y una 6-FEH, que podría hidrolizar estos enlaces.

La existencia de una 6-FEH fue demostrada y descrita en varias especies de Gramíneas forrajeras (Yamamoto y Mino, 1985; Simpson y col., 1991; Bonnett y Simpson, 1993; Henson, 1996).

Las actividades 6-FFT y 6-SST no lograron encontrarse hasta que Wiemken y col. describieron en cebada, una enzima que sintetiza 6-kestosa y es capaz de transferir fructosas en unión  $\beta$ -2,6 a oligosacáridos de mayor GP (Simmen y col., 1993; Duchateau y col., 1995). La sacarosa-fructan fructosiltransferasa (6-SFT) puede, junto con la 1-SST y la 1-FFT, explicar la síntesis del complejo patrón de fructanos de cebada y de Gramíneas en general. Esta importante enzima de la vía biosintética de fructanos de Gramíneas, se purificó a homogeneidad y se estudiaron sus características bioquímicas (Sprenger y col., 1995). La enzima nativa tiene un PM de 67 kDa, separándose en dos subunidades de 23 y 49 kDa por SDS-PAGE, coincidiendo con las enzimas de Compuestas. También posee

alta homología de secuencia de aminoácidos con otras enzimas de fructanos e INV ácidas.

Con este espectro de enzimas conocidas, la vía de síntesis de fructanos en Gramíneas ha sido elucidada (Figura 2), aunque falta todavía purificar a homogeneidad una de las enzima clave de esta ruta biosintética: la 1-SST de las Poaceae no ha sido aún caracterizada.



**Figura 3: Modelo de síntesis y degradación de fructanos en Gramíneas.**

**1-SST:** 1-sacarosa-sacarosa fructosil transferasa

**6-SFT:** 6-sacarosa-fructan fructosil transferasa

**1-FFT:** 1-fructan-fructan fructosil transferasa

**6G-FFT:** 6-glucosa fructan-fructan fructosil transferasa

**1-FEH:** 1-fructan exohidrolasa

**6-FEH:** 6-fructan exohidrolasa

F: fructosa

G: glucosa

GF: sacarosa, unión  $\beta$ -2,1 entre F y G.

F

GF: 1-kestosa, unión  $\beta$ -2,1 entre F y F.

GFF: 6-kestosa, unión  $\beta$ -2,6 entre F y F.

FGF: neokestosa, unión  $\beta$ -6,2 en FG y  $\beta$ -2,1 en GF.

n: residuos de fructosa, de 0 a 250 para Gramíneas.

## 2.5 - Fisiología y compartimentalización del metabolismo de fructanos

El metabolismo de fructanos en plantas está localizado en la vacuola. Tanto los azúcares como las enzimas que catalizan su síntesis y degradación, han sido hallados en la fracción vacuolar de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Frehner y col. 1984; Darwen y John, 1989; Carpita y col., 1991). También se ha descrito la actividad FEH en la vacuola de células de cebada (Wagner y Wiemken, 1986).

La acumulación de fructanos puede ser favorecida por condiciones que reducen la demanda de carbono fijado por supresión del crecimiento (frío, sequía, fertilización deficiente, infección fúngica), remoción de tejidos destino (remoción de macollos y frutos) o que favorecen la asimilación de CO<sub>2</sub> (Hendry, 1987; Pollock y Cairns, 1991).

En un reciente estudio, Koroleva y col. (1998) caracterizaron en cebada la acumulación de sacarosa y fructanos en células aisladas de tejidos de hoja, demostrando que la acumulación de estos azúcares se encuentra localizada en las células del mesófilo y de la vaina parenquimática, no encontrándose azúcares en las células de la epidermis. La acumulación de fructanos en estos dos tipos celulares comienza a determinadas concentraciones celulares de sacarosa (100 mM para las células de la vaina y 200 mM para las del mesófilo).

El tamaño molecular de los fructanos depende del estado fisiológico del tejido que lo contiene y de las condiciones ambientales, aunque el tamaño máximo alcanzado parece tener una base genética (Pollock y Chatterton, 1988).

Una de las características importantes de estos polímeros solubles de fructosa, que los distingue del almidón, es que pueden acumularse en altas concentraciones sin afectar la fotosíntesis. Varios miembros de la familia de las Compuestas contienen más del 50% del peso seco de sus tejidos de reserva en forma de fructanos (Pontis, 1990). Las Gramíneas pueden acumular hasta un 30% de su peso seco en el tallo, con un gradiente de acumulación desde el ápice a la base (Pollock y Cairns, 1991).

## 2.5 - Fisiología y compartimentalización del metabolismo de fructanos

El metabolismo de fructanos en plantas está localizado en la vacuola. Tanto los azúcares como las enzimas que catalizan su síntesis y degradación, han sido hallados en la fracción vacuolar de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Frehner y col. 1984; Darwen y John, 1989; Carpita y col., 1991). También se ha descrito la actividad FEH en la vacuola de células de cebada (Wagner y Wiemken, 1986).

La acumulación de fructanos puede ser favorecida por condiciones que reducen la demanda de carbono fijado por supresión del crecimiento (frío, sequía, fertilización deficiente, infección fúngica), remoción de tejidos destino (remoción de macollos y frutos) o que favorecen la asimilación de CO<sub>2</sub> (Hendry, 1987; Pollock y Cairns, 1991).

En un reciente estudio, Koroleva y col. (1998) caracterizaron en cebada la acumulación de sacarosa y fructanos en células aisladas de tejidos de hoja, demostrando que la acumulación de estos azúcares se encuentra localizada en las células del mesófilo y de la vaina parenquimática, no encontrándose azúcares en las células de la epidermis. La acumulación de fructanos en estos dos tipos celulares comienza a determinadas concentraciones celulares de sacarosa (100 mM para las células de la vaina y 200 mM para las del mesófilo).

El tamaño molecular de los fructanos depende del estado fisiológico del tejido que lo contiene y de las condiciones ambientales, aunque el tamaño máximo alcanzado parece tener una base genética (Pollock y Chatterton, 1988).

Una de las características importantes de estos polímeros solubles de fructosa, que los distingue del almidón, es que pueden acumularse en altas concentraciones sin afectar la fotosíntesis. Varios miembros de la familia de las Compuestas contienen más del 50% del peso seco de sus tejidos de reserva en forma de fructanos (Pontis, 1990). Las Gramíneas pueden acumular hasta un 30% de su peso seco en el tallo, con un gradiente de acumulación desde el ápice a la base (Pollock y Cairns, 1991).

La acumulación de fructanos en Compuestas y en Liliáceas ocurre generalmente en los órganos perennes antes de la dormancia, mientras que en las Gramíneas de climas templados, la síntesis de estos polímeros ocurre también en primavera y verano y no está restringida a órganos específicos (Pollock y Jones, 1979).

Las semillas maduras de los cereales de invierno tienen una concentración baja de fructanos (McLeod y McCorquodale, 1958). La concentración de fructanos es importante en los estadios iniciales del llenado de grano. Su síntesis declina a medida que la síntesis de almidón se establece, sugiriendo que la síntesis de estos polímeros ayudaría a mantener el gradiente de concentración de sacarosa entre el floema y los tejidos destino, minimizando la acumulación de solutos osmóticamente activos (Pollock y Cairns, 1991).



## 2.6 - Biología molecular del metabolismo de fructanos

Hasta 1995 no había sido clonado ningún gen correspondiente a las enzimas del metabolismo de fructanos de plantas superiores. Sin embargo, existían varios trabajos ensayando la acumulación de estos polímeros en plantas transformadas con genes bacterianos de enzimas de fructanos (sacarasas y levansacarasas) (Van der Meer y col. 1994; Ebskamp y col., 1994; Pilon-Smits, 1995; Caimi y col., 1996; Röber y col, 1996). Los polímeros producidos en las plantas transgénicas tienen PM mucho mayores y una estructura ramificada más compleja que los fructanos de plantas. Mientras que la mayor parte de los fructanos vegetales tiene un GP máximo de 250 residuos de fructosa, los bacterianos son polímeros ramificados con miles de monosacáridos por molécula y un tamaño estimado de 3 MDa (Dedonder, 1972).

La transformación se ensayó en tabaco, papa y maíz, dirigiéndose la expresión de la enzima a la vacuola. No se encontraron señales de hidrólisis de estos azúcares por las hidrolasas nativas en ninguna de las especies mencionadas, por lo que estos polímeros continuaron acumulándose en las células durante todo el ciclo celular. Las plantas, sin embargo, no mostraron ninguna diferencia fenotípica con respecto a los controles no transformados.

Pilon-Smits y col. (1995) transformaron plantas de tabaco con el gen SacB de la sacarasa de *Bacillus subtilis*. Las plantas transgénicas mostraron acumulación de fructanos y se usaron para ensayar estrés hídrico con soluciones de PEG 10.000. En las plantas transformadas tratadas con PEG se observó un aumento de siete veces del contenido de fructanos en comparación con las que fueron mantenidas en condiciones normales de riego. En este trabajo no se evaluó la supervivencia de estas plantas al déficit hídrico.

En 1995 se publicó el clonado y caracterización del primer gen del metabolismo de fructanos de plantas superiores. Sprenger y col. aislaron el ADNc de la 6-SFT de cebada, utilizando oligonucleótidos específicos deducidos a partir de fragmentos tripticos de la proteína purificada (Sprenger, 1995). El ARNm de la 6-SFT de cebada tiene un marco de lectura abierto de 626 codones

que incluyen la secuencia de las dos subunidades de la enzima y contiene seis posibles sitios de glicosilación. El clon aislado tiene alta homología de secuencia deducida de aminoácidos con INV ácidas de plantas y microorganismos y posee menor homología con las levansacarasas bacterianas.

Se han aislado también el ADNc de la SST de otras especies (*Cynara scolymus*, *Helianthus tuberosus*, *Allium cepa*) y de la 1-SST del hongo *Aspergillus foetidus* (Hellwege y col, 1997; van der Meer y col., 1998; Vijn y col, 1998; Rehm y col, 1998). También se aisló el ADNc de la 6-glucosa-FFT de cebolla, enzima responsable de la síntesis de inulinas de la serie de la neokestosa (Vijn y col., 1998) y el ADNc de la 1-FFT de *H. tuberosus* (van der Meer y col., 1998).

Recientemente el gen de la 1-SST de *Helianthus tuberosus* ha sido utilizado para transformar remolacha azucarera (Severier y col., 1998). Las plantas transgénicas obtenidas, mostraron la acumulación de altas cantidades de fructanos en sus raíces, convirtiéndose por lo tanto en un importante producto biotecnológico.

### 3 - Metabolismo de sacarosa en plantas

Como se mencionó anteriormente, en muchas especies vegetales se observa la acumulación de sacarosa en respuesta a condiciones de bajas temperaturas. La sacarosa, además, es el sustrato del cual se sintetizan los fructanos, por lo que ambas vías metabólicas están íntimamente relacionadas.

La sacarosa es el principal hidrato de carbono de transporte a través del floema en la mayoría de las especies vegetales. Este disacárido de fructosa y glucosa se sintetiza mayoritariamente en el citoplasma celular de los tejidos fuente de las plantas (tejidos fotosintéticos) y se transporta a órganos en activo crecimiento (tejidos destino). Sus carbonos derivan de las triosas-P, exportadas desde el cloroplasto, las cuales son convertidas a hexosas-P y finalmente a sacarosa.

El metabolismo de sacarosa depende de cuatro enzimas que están envueltas en su síntesis y degradación (Pontis, 1977) (Figura 4):

- 1) **Sacarosa-Fosfato Sintasa (SPS)** (UDP-glucosa: D-fructosa-6-fosfato 2-glucosil transferasa, EC 2.4.1.14)
- 2) **Sacarosa-Fosfato Fosfatasa (SPP)** (Sacarosa-6-Fosfato Fosfohidrolasa, EC 3.1.3.00)
- 3) **Sacarosa Sintasa (SS)** (UDP-glucosa: D-fructosa 2-glucosil transferasa, EC 2.4.2.13)
- 4) **Invertasa (INV)** ( $\beta$ -D-fructofuranósido fructohidrolasa, EC3.2.1.26), estas pueden ser divididas en INV ácidas o alcalinas, según su pH óptimo de actividad.

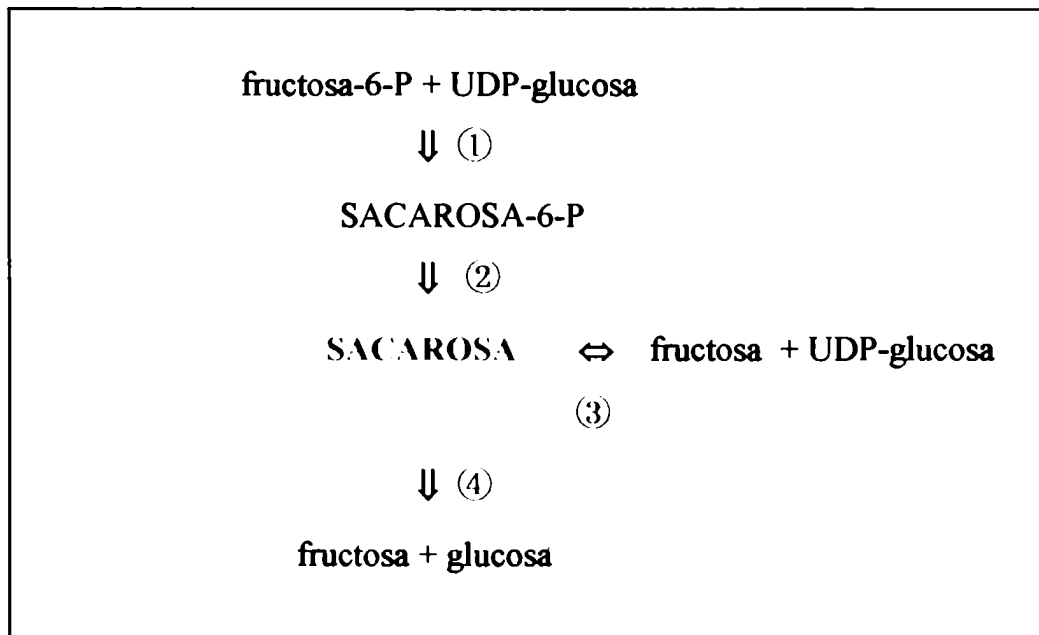
### 3 - Metabolismo de sacarosa en plantas

Como se mencionó anteriormente, en muchas especies vegetales se observa la acumulación de sacarosa en respuesta a condiciones de bajas temperaturas. La sacarosa, además, es el sustrato del cual se sintetizan los fructanos, por lo que ambas vías metabólicas están íntimamente relacionadas.

La sacarosa es el principal hidrato de carbono de transporte a través del floema en la mayoría de las especies vegetales. Este disacárido de fructosa y glucosa se sintetiza mayoritariamente en el citoplasma celular de los tejidos fuente de las plantas (tejidos fotosintéticos) y se transporta a órganos en activo crecimiento (tejidos destino). Sus carbonos derivan de las triosas-P, exportadas desde el cloroplasto, las cuales son convertidas a hexosas-P y finalmente a sacarosa.

El metabolismo de sacarosa depende de cuatro enzimas que están envueltas en su síntesis y degradación (Pontis, 1977) (Figura 4):

- 1) **Sacarosa-Fosfato Sintasa (SPS)** (UDP-glucosa: D-fructosa-6-fosfato 2-glucosil transferasa, EC 2.4.1.14)
- 2) **Sacarosa-Fosfato Fosfatasa (SPP)** (Sacarosa-6-Fosfato Fosfohidrolasa, EC 3.1.3.00)
- 3) **Sacarosa Sintasa (SS)** (UDP-glucosa: D-fructosa 2-glucosil transferasa, EC 2.4.2.13)
- 4) **Invertasa (INV)** ( $\beta$ -D-fructofuranósido fructohidrolasa, EC 3.2.1.26), estas pueden ser divididas en INV ácidas o alcalinas, según su pH óptimo de actividad.



**Figura 4: Enzimas del metabolismo de sacarosa en plantas.**

En esta importante vía metabólica, la SPS se ha identificado como uno de los puntos de control. Esta enzima se estudió en varias especies de mono y dicotiledóneas (espinaca, maíz, papa, arroz, soja, germen de trigo, etc.) y se demostró que puede estar sujeta a varios mecanismos de regulación. La actividad de la SPS tendría al menos tres niveles de regulación: uno estaría dado por la cantidad de proteína, relacionado a la transición de tejidos destino a tejidos fuente (Walker y Huber, 1989) y los otros dos niveles se relacionarían con la actividad enzimática: modificación por efectores alostéricos (control fino de activación con Glu-6-P e inhibición por Pi) (Doehler y Huber, 1983,1984) y modificación covalente de la proteína por fosforilación (control grueso) (Huber y col., 1989, 1991; Siegl y col., 1991). La fosforilación no tiene efecto sobre la velocidad máxima, sino que cambia la afinidad de la enzima por sus efectores alostéricos (Stitt y col., 1988).

La sacarosa puede ser degradada en plantas vía dos enzimas: la SS y la INV (ap Rees, 1984; Kruger, 1990).

La SS cataliza una reacción reversible. Está presente en altas actividades en tejidos heterotróficos (destino) de activo crecimiento o en activa acumulación de almidón, teniendo como función principal el clivaje de la sacarosa transportada por el floema (Chourey y Nelson, 1979; ap Rees, 1984; Stitt y Steup, 1985; Kruger, 1990; Geigenberger y Stitt, 1993). Sin embargo, estudios en tubérculos de papa, han demostrado que las concentraciones de sustratos y productos en este órgano son comparables a los de las Km respectivas, por lo que *in vivo* la SS podría catalizar tanto el clivaje como la síntesis de sacrosa (Geigenberger y Stitt, 1993).

Pontis y col. ensayaron varias condiciones en las que las actividades de síntesis y clivaje de la SS podían ser modificadas en forma diferencial (Pontis y Wolosiuk, 1972; Pontis y col., 1981; Pontis y Salerno, 1982). Estudios recientes proponen que la SS de maíz puede también ser fosforilada, lo cual provocaría una modificación de la relación de actividades de síntesis y clivaje (Huber y col., 1996).

Las INV se encuentran clasificadas, según su pH óptimo de actividad *in vitro*, en ácidas, neutras y alcalinas. Las INV ácidas resultan ser glicosiladas y se subdividen a su vez en extracelulares y vacuolares. Las INV extracelulares, asociadas con la pared celular, cumplen un importante rol en la descarga apoplástica del floema (Turgeon, 1989), incrementando la fuerza del destino por la remoción de la sacarosa liberada por el floema. También son inducidas por patógenos o daño, por lo que se sugiere que están envueltas en la respuesta de las plantas a estreses (Sturm y Chrispeels, 1991; Benhamou y col., 1990).

Las INV vacuolares se han encontrado en todos los tejidos de reserva. Estas INV no tienen una función clara en tejidos asimiladores, aunque se ha propuesto un rol de movilización de la sacarosa acumulada temporariamente en la vacuola (Obenland y col., 1993). Estudios de INV ácidas en cebada, arroz, trigo y *Lolium temulentum* (Krishnan y col. 1985; Obenland y col., 1993; Isla y col., 1995; Walker y col., 1997) describen a las enzimas vacuolares como multímeros de subunidades de aproximadamente 60 kDa, con Km para sacarosa entre 1 y 6 mM a pH entre 4,5 á 5,5. Todas estas enzimas parecen inhibirse por producto (fuctosa

y glucosa) y en distintos grados por piridoxal y otras moléculas relacionadas. *In vitro*, estas enzimas demostraron también sintetizar fructanos de bajo peso molecular a altas concentraciones de sacarosa (Cairns y Ashton, 1991; Cairns, 1993; Obenland y col., 1993).

#### 4 - Especies nativas como modelo de estudio

El metabolismo de fructanos en Gramíneas de clima templado, en relación con estreses ambientales, ha sido estudiado en su mayor parte en cereales de importancia agronómica (Robson y Jewiss, 1968; Chatterton y col. 1987; Suzuki, 1989; Tognetti y col., 1989; Tognetti y col, 1990; Solhaug, 1991; Santoiani y col, 1993; Bancal y Triboï, 1993; Livingston III y col, 1994; Equiza y col., 1997).

Dentro de los géneros de Gramíneas de clima templado, en las cuales se han encontrado una importante acumulación de fructanos, existen en la región patagónica de nuestro país especies adaptadas a ambientes en donde las temperaturas bajo cero y el déficit hídrico imperan en la mayor parte de los días del año (Boelcke, 1957; Soriano y Sala, 1986; Tognetti y Salerno, 1995). Las especies de plantas nativas de la Patagonia están sometidas durante su ciclo de vida a condiciones extremas de bajas temperaturas y déficit hídrico, por lo que constituyen excelentes sistemas para el estudio de respuestas a factores ambientales adversos. Varias de las especies de Gramíneas de esta región son las forrajeras más importantes de las pasturas naturales que sustentan la producción ovina patagónica y han sido ampliamente estudiadas por ser especies potenciales para producción de forraje y revegetación de áreas erosionadas. Especies de *Bromus*, *Poa*, *Festuca*, *Agropyron*, *Elymus* y *Hordeum* se incluyen en este grupo (Somlo y col., 1985; Nicora y Rúgolo de Agrasar, 1987; Oliva y col., 1993; 1994).

La mayor parte de estas especies forman parte de la flora altamente afectada por el sobrepastoreo sufrido en toda la región patagónica y dramáticamente devastador para las mesetas áridas y semiáridas de la región. En este sentido, estudios que han relacionado el sobrepastoreo de la vegetación del oeste de Chubut, incluyen a especies como *Poa ligularis*, *Bromus setifolius*, *Hordeum commosum* y *Festuca pallescens* como sensibles a altas presiones de pastoreo y forman parte de una lista más extensa de especies en peligro (Soriano y col., 1994):



Del total de especies registradas en la Flora Patagónica (Correa, 1978), las familias mejor representadas son la Poaceae y la Asteracea, coincidiendo con los grupos taxonómicos de importantes acumuladores de fructanos.

Entre las Gramíneas nativas de nuestro país, las del género *Bromus* se caracterizan por tener tanto especies patagónicas, como otras distribuidas en hábitats más benignos. *Bromus pictus* Hook. es una especie de Gramínea del complejo *Bromus setifolius* (Naranjo y col., 1990), de hojas no lineales, que crece en las estepas áridas de la región patagónica de nuestro país. En esta región, las condiciones extremas de bajas temperaturas y disponibilidad de agua (la temperatura media en julio es de 1,9 °C y las precipitaciones anuales promedio sólo llegan a los 168 mm en el área) influyen en el crecimiento y la mortalidad de las plantas. Esta especie ha sido estudiada profundamente a nivel ecofisiológico (Soriano y Sala, 1986; Aguiar y col., 1992; Aguiar y Sala, 1994) (Figura 5).

*Bromus auleticus* Trin. ex Nees o cebadilla chaqueña es una especie perenne, de cañas robustas y erguidas, originaria de los campos gramíneos de la Argentina, Brasil austral y Uruguay, que vegeta desde mediados de otoño y primavera y es la única especie nativa de estas regiones que permanece verde durante el invierno (Nicora y Rúgolo de Agrasar, 1987) (Figura 5).

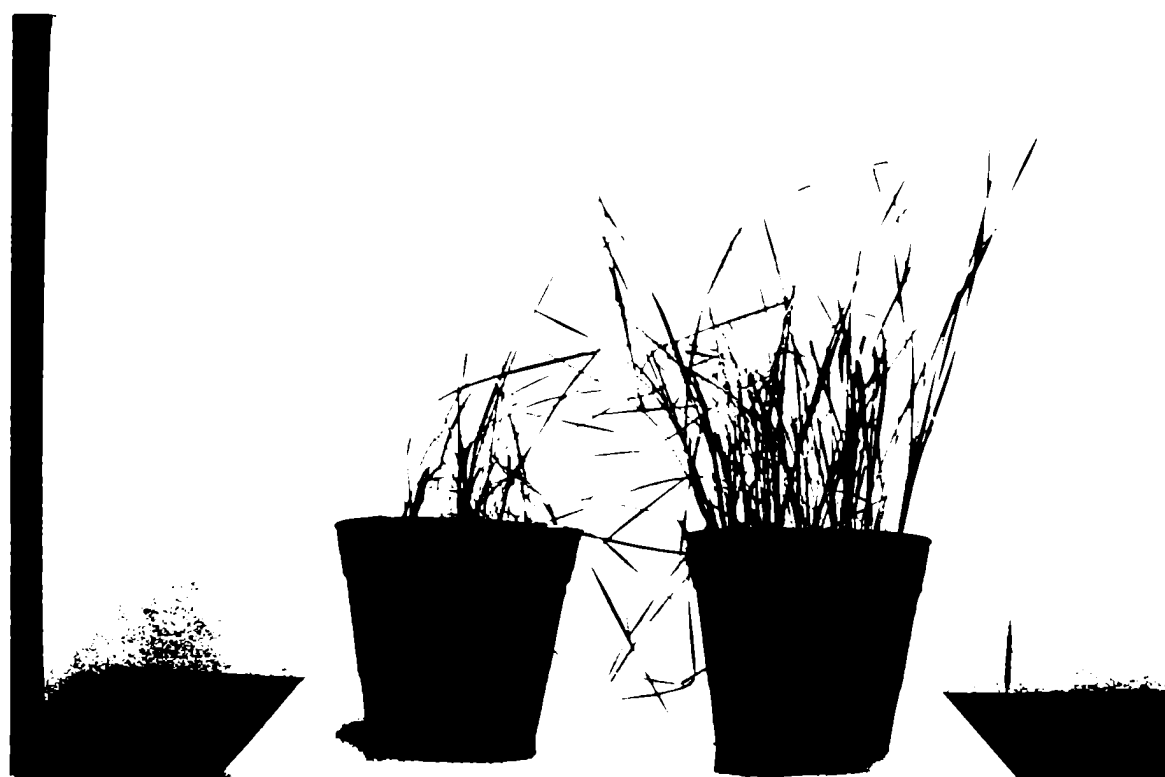
Debe destacarse que no existe publicado hasta el momento ningún estudio a nivel bioquímico de los metabolismos de estas especies nativas. La construcción de una biblioteca de ADNc tampoco ha sido llevada a cabo en ninguna especie de planta nativa de nuestro país.

Del total de especies registradas en la Flora Patagónica (Correa, 1978), las familias mejor representadas son la Poaceae y la Asteracea, coincidiendo con los grupos taxonómicos de importantes acumuladores de fructanos.

Entre las Gramíneas nativas de nuestro país, las del género *Bromus* se caracterizan por tener tanto especies patagónicas, como otras distribuidas en hábitats más benignos. *Bromus pictus* Hook. es una especie de Gramínea del complejo *Bromus setifolius* (Naranjo y col., 1990), de hojas no lineales, que crece en las estepas áridas de la región patagónica de nuestro país. En esta región, las condiciones extremas de bajas temperaturas y disponibilidad de agua (la temperatura media en julio es de 1,9 °C y las precipitaciones anuales promedio sólo llegan a los 168 mm en el área) influyen en el crecimiento y la mortalidad de las plantas. Esta especie ha sido estudiada profundamente a nivel ecofisiológico (Soriano y Sala, 1986; Aguiar y col., 1992; Aguiar y Sala, 1994) (Figura 5).

*Bromus auleticus* Trin. ex Nees o cebadilla chaqueña es una especie perenne, de cañas robustas y erguidas, originaria de los campos gramíneos de la Argentina, Brasil austral y Uruguay, que vegeta desde mediados de otoño y primavera y es la única especie nativa de estas regiones que permanece verde durante el invierno (Nicora y Rúgolo de Agrasar, 1987) (Figura 5).

Debe destacarse que no existe publicado hasta el momento ningún estudio a nivel bioquímico de los metabolismos de estas especies nativas. La construcción de una biblioteca de ADNc tampoco ha sido llevada a cabo en ninguna especie de planta nativa de nuestro país.



**Figura 5:** Plantas adultas de las especies nativas *Bromus auleticus* Trin. ex Nees y *Bromus pictus* Hook., crecidas en cnartos de cultivo.

## 5 - Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de tolerancia a las bajas temperaturas y al déficit hídrico, a través de estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de sacarosa y fructanos en especies de Gramíneas nativas.

Para abordar el estudio propuesto de las bases bioquímicas, fisiológicas y moleculares de la tolerancia a frío y sequía, se realizó un estudio comparativo entre especies de géneros de Gramíneas nativas que contienen fructanos, tomando a una especie patagónica como modelo de planta tolerante adaptada a ambientes de escasa disponibilidad de agua y bajas temperaturas y a otra especie de Gramínea del mismo género, nativa de ambientes menos rigurosos.

*Bromus pictus* Hook. y *Bromus auleticus* Trin. ex Nees, especies patagónica y del norte de nuestro país respectivamente, se usaron para realizar la comparación bioquímica del metabolismo de azúcares en respuesta a frío y sequía

A partir de la comparación entre estas especies adaptadas a condiciones climáticas contrastantes, se intentó el aislamiento de genes relacionados con este metabolismo en la especie tolerante, para determinar en el futuro la implicancia de estos genes en la tolerancia de estas especies a estreses ambientales, a través de transformación genética de plantas.

# **MATERIALES Y METODOS**

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1 - Material biológico**

#### **1.1 - Material vegetal**

Las semillas de las especies elegidas fueron solicitadas y gentilmente cedidas por las siguientes personas:

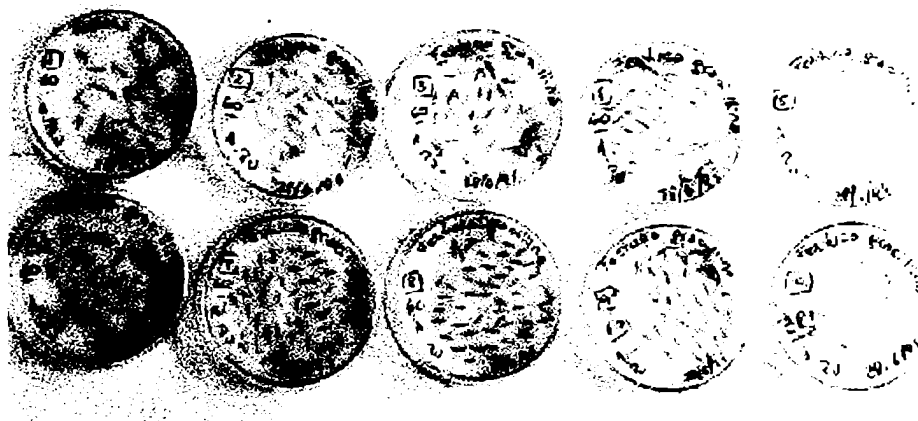
- Ing. Agr. Sergio Alemano, Fac. Cs. Exactas, UNRC (*Bromus auleticus*).
- Ing. Agr. Griselda Bonvisutto, INTA-EEA-Bariloche (*Festuca gracillima*, *Festuca pallescens*).
- Lic. Leopoldo Montes, INTA-EEA-Santa Cruz (*Agropyron magellanicum*, *Festuca gracillima*, *Festuca pallescens*).
- Ing. Agr. Olegario Royo Pallarés, INTA-EEA-Mercedes (*Bromus auleticus*)
- Ing. Agr. Alberto Soriano, IFEBA, Fac. Agronomía, UBA (*Bromus pictus*).

#### **1.2 - Cultivo de especies silvestres en cuartos de cultivo**

Se probaron varios sustratos y temperaturas de crecimiento para optimizar el cultivo de estas especies nativas.

Los sustratos ensayados fueron: arena; arena:vermiculita/1:1(v/v); arena:vermiculita:tierra/1:1:1(v/v); vermiculita

Todas las semillas fueron tratadas previamente con hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos, lavadas con agua estéril y luego sumergidas en fungicida durante 10 minutos, antes de ponerlas a germinar sobre papel de filtro húmedo en cajas de Petri.



Las plantas se regaron diariamente con agua destilada y se fertilizaron semanalmente con solución nutritiva de Hoagland al 50% (Hoagland y Arnon, 1950).

Se crecieron las plantas a 20, 25 y 30 °C.

Los mejores resultados se obtuvieron creciendo a las plantas en macetas de 20 cm de diámetro con vermiculita, en cuartos de cultivo a 20°C, con una irradiancia de 300  $\mu$ E y un régimen de 14 hs. de luz y 10 hs. de oscuridad. Luego de 60 á 90 días de crecimiento, las plantas se utilizaron para realizar tratamientos con bajas temperaturas y déficit hídrico. En el caso del estrés por frío, se utilizaron las cinco especies antes mencionadas. Los experimentos de sequía fueron realizados solamente en las especies de *Bromus*.

### 1.3 - Cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* usadas fueron: XL1-BLUE para la construcción de la biblioteca de ADNc y DH5 $\alpha$  para todos los subclonados. Todos los cultivos se hicieron en medio LB (triptona 5g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l, según Sambrook y col., 1989) a 37°C con agitación vigorosa.

## **2. - Estrés ambientales**

### **2.1 - Tratamiento con bajas temperaturas**

Se usaron plantas adultas de las cinco especies mencionadas para ensayar tratamientos con bajas temperaturas sobre cero.

Luego del período de crecimiento, se transfirieron macetas con plantas de cada especie a cuartos de cultivo a  $4 \pm 2$  °C, manteniendo sin alteración las condiciones de irradiancia, fotoperíodo e irrigación.

### **2.2 - Tratamiento de déficit hídrico**

El tratamiento de estrés hídrico se ensayó sobre la especies *B.auleticus* y *B.pictus*, utilizando polietilen glicol (PEG) 8.000. En primera instancia se probó el cultivo en condiciones hidropónicas, usando peceras de vidrio y redes plásticas como soportes. El largo período de crecimiento de estas especies silvestres hasta llegar a la madurez, provocó la contaminación microbiológica de la solución nutritiva y de las raíces, por lo que esta metodología tuvo que ser descartada.

El ensayo de déficit hídrico que finalmente se utilizó en el presente trabajo, se realizó regando las plantas crecidas en vermiculita, con soluciones de PEG 8.000 en concentraciones crecientes (5, 10 y 20%) en solución nutritiva de Hoagland al 50%.

Se midieron los potenciales osmóticos ( $\Psi_0$ ) correspondientes a distintas concentraciones de PEG 8.000, utilizando cámaras Wescor C-52, con los que se determinaron las condiciones de estrés hídrico impuestas a las plantas en el tratamiento de sequía.



El contenido relativo de agua (CRA) de las hojas de las especies de *Bromus*, se midieron en la primera hoja expandida como:

$$\text{CRA} = \text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco} / \text{Peso Turgente} - \text{Peso Seco}$$

El peso turgente se midió luego de la incubación de la hoja en una atmósfera saturada con agua hasta peso constante. El peso seco se determinó luego de liofilizar o secar las hojas en estufa a 85°C hasta alcanzar peso constante.

### **2.3 - Muestreo y conservación del material vegetal**

Ambos tratamientos se prolongaron durante 7 días. A diferentes tiempos (1, 2, 4 y 7 días) se colectaron muestras de vástagos y/o de raíces de las especies vegetales, los que fueron pesados, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C para su posterior análisis.

Las muestras utilizadas para extracción de azúcares solubles, se liofilizaron a sequedad y se guardaron herméticamente a 4°C. Se compararon los resultados obtenidos en extractos de material fresco congelado y liofilizado, no observándose diferencias entre los métodos de conservación utilizados.

### **3 – Extracción y análisis de azúcares solubles**

#### **3.1 – Extracción**

Los azúcares solubles del material vegetal colectado, se extrajeron con agua amoniacal según Tognetti y col. (Tognetti y col., 1989), utilizando material congelado o liofilizado.

Los extractos de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* requirieron la adición de trazas de ácido ascórbico en la solución de extracción, para minimizar la oxidación de los mismos. Se sembraron los extractos crudos en columnas con resinas de intercambio iónico (Mixed Bed, BioRad), para eliminar compuestos cargados que interfieren con las cromatografías, luego de lo cual se liofilizaron a sequedad y se resuspendieron en agua amoniacal.

#### **3.2 – Análisis por métodos colorimétricos**

Se cuantificaron los fructanos por el método de Percheron (1962). Se midieron los azúcares reductores de los extractos por el método de Somogyi-Nelson (Spiro, 1966).

#### **3.3 – Análisis por cromatografía en papel**

Alícuotas de los extractos se sembraron en papel Whatman N° 1 ó 3 y se desarrollaron en forma descendente utilizando como solvente la mezcla 1-butanol : piridina : agua (6:4:3; v/v) durante 24-30 hs. Los azúcares conteniendo fructosa se revelaron con reactivo de naftoresorcinol (Forsyth, 1948).

La cuantificación de sacarosa de las muestras se realizó eluyendo la zona de corrida del disacárido luego de la cromatografía, con agua amoniacal a 100°C, luego de lo cual se cuantificó por el método de Percheron (1962).

### **3.4 – Análisis por cromatografía en capa delgada**

Los fructanos fueron separados en placas Schleider & Schull F-1500, en cromatografía ascendente, usando 1-butanol : 2-propanol : agua (3:12:4;v/v), en tres desarrollos. Las placas se revelaron con el reactivo de urea-ácido-ortofosfórico (Dedonder, 1952) para la identificación de azúcares conteniendo fructosa.

### **3.5 – Análisis por cromatografía de exclusión molecular**

Los miembros de la serie de fructanos de las especies *Helianthus tuberosus*, *Triticum aestivum* y *Bromus pictus* fueron separados en una columna de Bio-Gel P2 extra fino, BioRad (2 x 0,005 m) según Pontis (1968).

Se realizaron extractos acuosos de azúcares solubles de tubérculos maduros de *H.tuberosus* y vástagos de trigo cv San Agustín, expuestos 74 días a bajas temperaturas, utilizando el protocolo detallado anteriormente. Las cromatografías se corrieron con agua a pH 8 con 0,2% de azida sódica para prevenir contaminaciones microbiológicas. Se recogieron fracciones y se analizaron los fructofuranósidos por cromatografía en papel y por el método de Percheron (1962).

### **3.6 – Análisis por cromatografía de intercambio aniónico acoplada a detección amperométrica de pulsos**

Los oligosacáridos se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico acoplada a detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD). El análisis se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. N. J. Chatterton, de la Universidad de Utah, U.S.A. Se usó una columna HPIC-AS6 conteniendo estirendivinilbenceno y un detector Dionex Series 4000. Las muestras fueron purificadas y las fracciones

fueron comparadas con estándares conocidos preparados y corridos según Chatterton y col. (1989).

## **4 – Extracción y análisis de proteínas solubles**

### **4.1 – Extracción y cuantificación de proteínas solubles**

#### **a) Extracción de proteínas para medición de actividades enzimáticas en extractos crudos**

Muestras de raíces y vástagos de plantas control y tratadas y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se homogeneizaron con mortero bajo nitrógeno líquido. Los homogenatos se prepararon extrayendo el polvo obtenido con buffer HEPES 100mM, pH 7,5,  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 2 mM, PMSF 0,5 mM, etilenglicol 2% (v/v) y 20% (v/v) de glicerol.

Los extractos se centrifugaron 30 minutos a  $20.000 \times g$  y el sobrenadante fue usado inmediatamente para los ensayos de sacarosa-sacarosa fructosil transferasa (SST) o filtrados a través de columnas de Sephadex G-50 para separar los azúcares contenidos en el extracto proteico, antes de medir las restantes actividades enzimáticas.

Los extractos de vástagos de ambas especies mostraron niveles altos de compuestos oxidados, que luego interfirieron con las mediciones de actividad, dando blancos de reacción con absorbancias altas, por lo que se debieron filtrar por dos columnas consecutivas de Sephadex G-50 (BioRad) hasta obtener extractos no coloreados, sin pérdida de proteína total.

#### **b) Extracción de proteínas para purificación de SST**

Vástagos de plantas de *Bromus pictus* tratadas por 7 días a  $4^{\circ}\text{C}$  fueron cosechados y guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción. Se extrajeron las proteínas

solubles con buffer de Mcllvaine (1921) 50 mM pH 5,2, PVPP 1%, NaHSO<sub>3</sub> 10 mM, PMSF 0,1 mM, pepstatin A 1µg/ml y β-mercaptoetanol 10 mM. Una fracción de los extractos se filtró por columnas de Sephadex G-50 para medir actividad en extracto crudo, el resto se usó para los posteriores pasos de purificación.

#### c) Cuantificación

Se cuantificaron los extractos proteicos por el método de Bradford ( 1976).

### **4.2 – Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**

Fracciones de los extractos crudos se mezclaron con buffer de siembra y se corrieron en geles de poliacrilamida al 8% con SDS, según Salerno y col. (1989). También se realizaron geles de poliacrilamida en gradiente de 10 a 15%. Las proteínas se tiñieron con azul de Coomasie.

### **4.3 – Estudios tipo “western”**

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se usaron para la detección inmunológica de sacarosa-fosfato sintasa (SPS) y sacarosa sintasa (SS) utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra SPS y SS de hoja de arroz, desarrollados en el laboratorio (Lic. G. Pagnussat según Salerno y col. ,1989).

Las membranas se revelaron por el método de la fosfatasa alcalina acoplada a detección colorimétrica, según Salerno y col. (1989).

## **5 – Medición de actividades enzimáticas**

### **5.1 – Actividad sacarosa-fosfato sintasa**

La actividad SPS se midió por determinación de la sacarosa formada luego de la incubación de los extractos enzimáticos, en condiciones de velocidad máxima con buffer HEPES 100 mM pH 7,5;  $\text{MgCl}_2$  20 mM, UDP-Glc 10 mM y en presencia de Fru-6P 10 mM, Glc-6P 50 mM y arbutina 10 mM. La sacarosa formada se cuantificó, luego de la remoción con álcali de la fructosa-6P remanente, por el método de Percheron (1962).

### **5.2 – Actividad sacarosa sintasa**

La SS fue medida por formación de sacarosa, luego de la incubación de los extractos enzimáticos en buffer HEPES 100 mM pH 7,5;  $\text{MgCl}_2$  20 mM, UDPGlc 10 mM y en presencia de Fru 10 mM. La fructosa remanente se destruyó con álcali y se cuantificó la sacarosa formada por el método de Percheron (1962).

### **5.3 – Actividad invertasa ácida**

La actividad INV se midió en buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5 y 20 mM de sacarosa, en el caso de la medición de actividades en extractos crudos y a pH 5,2 con sacarosa 200 mM en el seguimiento de la actividad durante la purificación de la SST. Los azúcares reductores formados se midieron por el método de Somogyi y Nelson (Spiro, 1966)

Las actividades SS, SPS e INV se ensayaron incubando a 30°C, en volúmenes finales de 50  $\mu\text{l}$  durante una hora, tiempo en el que las actividades se mantuvieron lineales.

## **5.4 – Actividad de sacarosa-sacarosa fructosil transferasa**

### **5.4.1 – Método radiactivo acoplado a cromatografía en papel**

La actividad SST se ensayó por incubación de los extractos crudos a 30°C durante 4-6 hs., tiempo durante el cual la actividad se mantuvo lineal, con sacarosa [ $^{14}\text{C}$ ] 200mM (259 Bq/ $\mu\text{mol}$ ) en buffer acetato de sodio 100 mM pH 5,2, en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción fue analizada por cromatografía en papel como se describió anteriormente. La zona del trisacárido fue fraccionada y su radiactividad cuantificada en un contador de centelleo.

### **5.4.2 - Desarrollo de un método enzimático-colorimétrico**

Se utilizaron vástagos de plantas de *Bromus pictus*, *Triticum aestivum* y *Hordeum vulgare*, tubérculos de *Heliantus tuberosus* y raíces de *Cichorium intybus*, crecidas y tratadas con bajas temperaturas como se describió anteriormente, para el desarrollo de esta metodología.

La enzima Sacarasa comercial (Megazyme) se preparó disolviendo 50 U Sacarasa en 100 ml de buffer Maleato de sodio 100 mM pH 6,5. La solución se fraccionó y guardó en alícuotas de 1 ml a -20° C hasta su uso.

La actividad SST se incubó en las mismas condiciones que se describe para el método radiactivo. A partir de estos tubos de reacción se tomaron alícuotas de 10 a 20  $\mu\text{l}$  y se adicionaron a tubos conteniendo 0,25 U de Sacarasa en buffer maleato de sodio 50 mM pH 6,5 en un volumen total de 400  $\mu\text{l}$ . La hidrólisis de la sacarosa remanente se llevó a cabo incubando 1 h. a 40° C. Se trataron alícuotas en 0,4 M NaOH por 10 minutos a 100° C, se enfrió y se cuantificó el producto por el método de Percheron (1962).

Paralelamente, se midieron las actividades SST por el método radiactivo descrito anteriormente para comparar ambos métodos.

Los resultados presentados son un promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

## **6 - Purificación parcial de la actividad sacarosa-sacarosa fructosil transferasa de vástagos de plantas de *Bromus pictus* expuestas a bajas temperaturas**

Para los ensayos de purificación se usaron plantas de *Bromus pictus* sometidas a 7 días de bajas temperaturas.

El extracto se centrifugó 20 minutos a 20.000 x g y el sobrenadante se filtró por lana de vidrio (**Extracto crudo**)

Se ensayaron los siguientes pasos de purificación:

- Precipitación con sulfato de amonio: El extracto crudo fue sometido a precipitaciones con sulfato de amonio con los siguientes cortes: 0-30% / 30-60% / 30-80% / 60-80%.
- En todos los casos, los extractos se incubaron en presencia de la sal, una hora con agitación a 4°C y se centrifugaron por 15 minutos a 15.000 x g. Los precipitados se resuspendieron en 1-3 ml de buffer de McIlvaine (1921) 50 mM pH 5,2 con CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM.
- Diálisis: Los precipitados resuspendidos se dializaron durante una hora contra 0,5-1 l buffer citrato-fosfato de sodio 20 mM pH 5,2, haciendo tres cambios de buffer.
- Cromatografía de afinidad: la fracción dializada con mayor actividad SST se usó para separar glicoproteínas usando una columna de Concanavalina A-Sepharose (10 X 1 cm) equilibrada con buffer acetato de sodio 20 mM pH 5,2 con CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM.



La columna se sembró y lavó con el buffer de equilibrio suplementado con los inhibidores de proteasas usados en el extracto crudo. Se recogieron fracciones de 2 ml.

Las glicoproteínas se eluyeron con 50 ml de metil- $\alpha$ -manopiranosido 250 mM en buffer de lavado con 15% glicerol. Se colectaron fracciones de 0,5 ml a 0,5 ml/min.

- Cromatografía de intercambio aniónico:

**a) DEAE-Sephacel**

Las fracciones purificadas en la cromatografía con Concanavalina A-Sepharose se sembraron en una columna de DEAE-Sephacel (10 X 1 cm) equilibrada con buffer acetato de sodio 20 mM pH 5,2. Se lavó con 5 ml de buffer suplementado con inhibidores de proteasas y 10% de glicerol. La elución se realizó por un gradiente lineal de 0-500 mM de NaCl (50 ml). Se colectaron fracciones de 0,5 ml.

**b) MonoQ**

Fracciones provenientes de la cromatografía en ConA-Sepharose se utilizaron para ensayar una cromatografía de intercambio aniónico en FPLC. Se sembró la muestra en una columna MonoQ y se corrió a 1,5 MPa.

Se hizo un lavado con 5 ml de buffer acetato de sodio 20 mM pH 5,2 con PMSF 0,1 mM y luego se eluyó con un gradiente lineal de 0-500 mM de NaCl (50 ml). Se colectaron fracciones de 0,5 ml.

- Cromatografía de interacción hidrofóbica: fracciones concentradas provenientes de la cromatografía en DEAE-Sephacel se sembraron en una columna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (5 X 1 cm). Se equilibró con buffer acetato de sodio 20 mM pH 5,2. La elución se realizó con un gradiente lineal decreciente de 2-0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en buffer suplementado con inhibidores de proteasas y 10% de glicerol (20 ml ). Se colectaron fracciones de 0,6 ml.

- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS: las fracciones proteicas concentradas de los distintos pasos de purificación se separaron en geles desnaturalizantes de acrilamida al 8%, según Salerno y col. (1989).

Todos los pasos de purificación fueron llevados a cabo a 4°C. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976).

Se midieron las actividades de SST e INV, en las condiciones detalladas anteriormente.

Las determinaciones de actividad SST, medidas con inhibidores de INV, se realizaron utilizando HCl-Piridoxal en concentraciones 20 ó 50 mM, según el experimento.

La curva de actividad SST vs. pH fue realizada con buffers de la serie de McIlvaine (1921), en el rango de pH 3-7,5.

## **7 - Determinación de daño celular con reactivos fluorescentes**

Las raíces de plantas control y de plantas sometidas a sequía se incubaron con compuestos fluorescentes para determinar viabilidad celular por medio de microscopía de fluorescencia. Se utilizó ioduro de propidio (100 µg/ml) como determinante de mortalidad celular *in vivo*. Los tejidos se incubaron una hora en la solución con ioduro de propidio y luego se infiltraron los tejidos cinco minutos con vacío. Para las observaciones se utilizó un microscopio Zeiss Axioplan MC80, EPIHB050, con filtro para epifluorescencia. Las células que mostraron núcleos rojos, observadas al microscopio de fluorescencia, corresponden a células muertas. Se utilizaron películas Kodak color de 400 asa para tomar fotografías de las observaciones microscópicas.

## 8 - Protocolos de técnicas básicas de biología molecular

Las siguientes técnicas se realizaron según se describe en Sambrook y col., 1989:

- Minipreparaciones y maxipreparaciones de plásmido, por método de lisis alcalina.
- Obtención de células competentes de *E. coli*.
- Transformación genética de células de *E. coli*.
- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa nativos (ADN) y desnaturalizantes (ARN).
- Transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nylon.

Los fragmentos de digestión de ADN, PCR y los vectores utilizados para secuenciación, se purificaron con "kits" de prepAgene (BioRad) y QIAGEN (Germany).

La marcación de sondas con [ $\alpha^{35}\text{P}$ ] dCTP por marcación al azar se realizó con "kits" de DuPont (USA) y Promega (USA).

## 9 – Extracción de ADN y ensayos tipo "Southern"

La extracción del ADN genómico de vástagos de *Bromus pictus* se realizó según el protocolo de Dellaporta, Wood & Hicks (1983). Se tomaron alícuotas y se midieron absorbancias a 260 y 280 nm para cuantificar y verificar la pureza.

Se corrieron fracciones de las extracciones en geles de agarosa al 0,6% para verificar la integridad del ADN genómico, luego de lo cual se digirió el ADN con las enzimas de restricción EcoR I y Hind III.

El ADNc completo de la 6-SFT de cebada fue cedido gentilmente por el Dr. A. Wiemken, del Botanisches Institut der Universität, Basilea, Suiza, para utilizarlo como sonda heteróloga en las hibridaciones con ácidos nucleicos.

Los fragmentos transferidos a membranas de nylon se hibridaron con la sonda heteróloga radiactiva del ADNc completo de la 6-SFT de cebada. La hibridación se llevó a cabo a 55 °C en buffer de hibridación conteniendo buffer fosfato de sodio 0,5 M pH 7, BSA 1% y SDS 7% o buffer PAES durante toda la noche con agitación. Las membranas fueron luego lavadas de una a tres veces por 15 minutos con SSC 1X / SDS 0,1 %. La hibridación con la sonda homóloga BP760-G11 se llevó a cabo con buffer PAES a 65°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron a alta astringencia con SSC 0,1X/ SDS 0,1% a 65°C.

Las membranas se expusieron sobre placas fotográficas de alta sensibilidad (Kodak, XOMAT).

## **10 - Extracción de ARN y ensayos tipo "Northern"**

Se extrajo el ARN total de distintos órganos de plantas de *Bromus pictus* siguiendo el protocolo de Schuler & Zielinski (1991) o el protocolo de Trizol (GIBCO-BRL). Los extractos se guardaron en agua ó 50% de etanol a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría y la calidad del ARN extraído se verificó en geles desnaturalizantes de agarosa al 1,5% con formaldehído, según el protocolo descrito en Sambrook y col.(1989).

Los ARN transferidos a membranas de nylon se hibridaron y lavaron con las mismas condiciones que en los ensayos tipo "southern".

## **11 - Construcción de una biblioteca de ADN copia en fagos**

Se construyó una biblioteca de ADN copia en fagos a partir de ARN total de vástagos de plantas de *Bromus pictus* expuestas a 7 días de bajas temperaturas, extrayendo con Trizol.

La biblioteca de ADN copia, el escrutinio y la escisión de los fagémidos se llevó a cabo según el protocolo del "kit"  $\lambda$ -ZAP II (Stratagene, USA).

## 12 - Hibridación con sondas heterólogas de cebada

Los estudios tipo “southern” y “northern” y el escrutinio de la biblioteca se realizó utilizando el ADNc entero (2,2 kb) o un fragmento de 1,1 kb de digestión con Pst I de la 6-sacarosa fructan fructosil transferasa (6-SFT) de cebada (*Hordeum vulgare*) .

## 13 - Síntesis de ADNc de *Bromus pictus* para RT-PCR

Se sintetizó ADNc a partir de ARN total de vástagos de *Bromus pictus* expuestos 7 días a estrés por frío. La síntesis se llevó a cabo usando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA) y 2µg de ARN. Se ensayó la síntesis usando un oligonucleótido específico (L<sub>2</sub>, ver más adelante), oligonucleótidos al azar y oligo-dT, en las concentraciones y a las temperaturas requeridas por la enzima según el catálogo.

## 14 - Reacción en cadena de la polimerasa

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias conocidas de los genes de fructanos clonados, en lugares conservados tanto en mono como en dicotiledóneas:

U<sub>1</sub>: 5'- TTCTACCAGTACAA  $\begin{bmatrix} C \\ T \end{bmatrix}$  CC - 3' (Oligonucleótido degenerado en la base  
15: C ó T)

U<sub>2</sub>: 5'- TGGGGATCGGGTTGAGATACGA - 3'

L<sub>1</sub>: 5'- GACGCATAAACTTTCC - 3'

L<sub>2</sub>: 5'- CCGGTGGCGTTGTTGAACAA - 3'

Se pusieron a punto los protocolos de amplificación, utilizando distintas concentraciones de  $MgCl_2$  y distintas temperaturas de apareamiento de oligonucleótidos.

Se diseñó un programa de amplificación, que resultó ser el óptimo para la amplificación de secuencias únicas del tamaño esperado de ADNc para cada combinación de oligonucleótidos: 5 min a 93°C, 35 ciclos de 1 min a 93°C, 1 min a 55°C para  $U_1L_2$  y 60°C para  $U_2L_2$ , 2 min a 72°C y una extensión de 10 min a 72°C.

Se amplificaron secuencias de ADNc y genómicas de las especies de *Bromus* utilizando este programa.

## **15 – Secuenciación y análisis de secuencias**

Los fragmentos de ADNc amplificados por la técnica de RT-PCR se secuenciaron por el método de Sanger y col., (1977) con el kit del “fmol DNA Sequencing System” de Promega (USA) o por secuenciación automática (Research genetics SeqEXPRESS, USA).

Todas las secuencias fueron comparadas contra bancos de datos (BLAST DATABASE, non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences).

Las secuencias fueron analizadas con los programas MegAlign, Secman y EditSeq.

# **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1 – Análisis comparativo de la acumulación de azúcares en distintas especies de Gramíneas nativas sometidas a frío

Se comenzó el estudio del metabolismo de fructanos frente al estrés por frío en Gramíneas patagónicas, analizando el comportamiento de las distintas especies en cuanto a la acumulación de fructanos. Para ello se realizaron extractos de azúcares de vástagos de plantas de las especies *Agropyron magellanicum*, *Festuca pallescens*, *Festuca gracillima*, y *Bromus pictus*.

El análisis cromatográfico de extractos acuosos de hojas de todas las especies antes mencionadas, expuestas a tratamiento de frío, revelaron diferencias significativas en la cantidad de fructanos acumulados entre los distintos géneros (Figura 6).

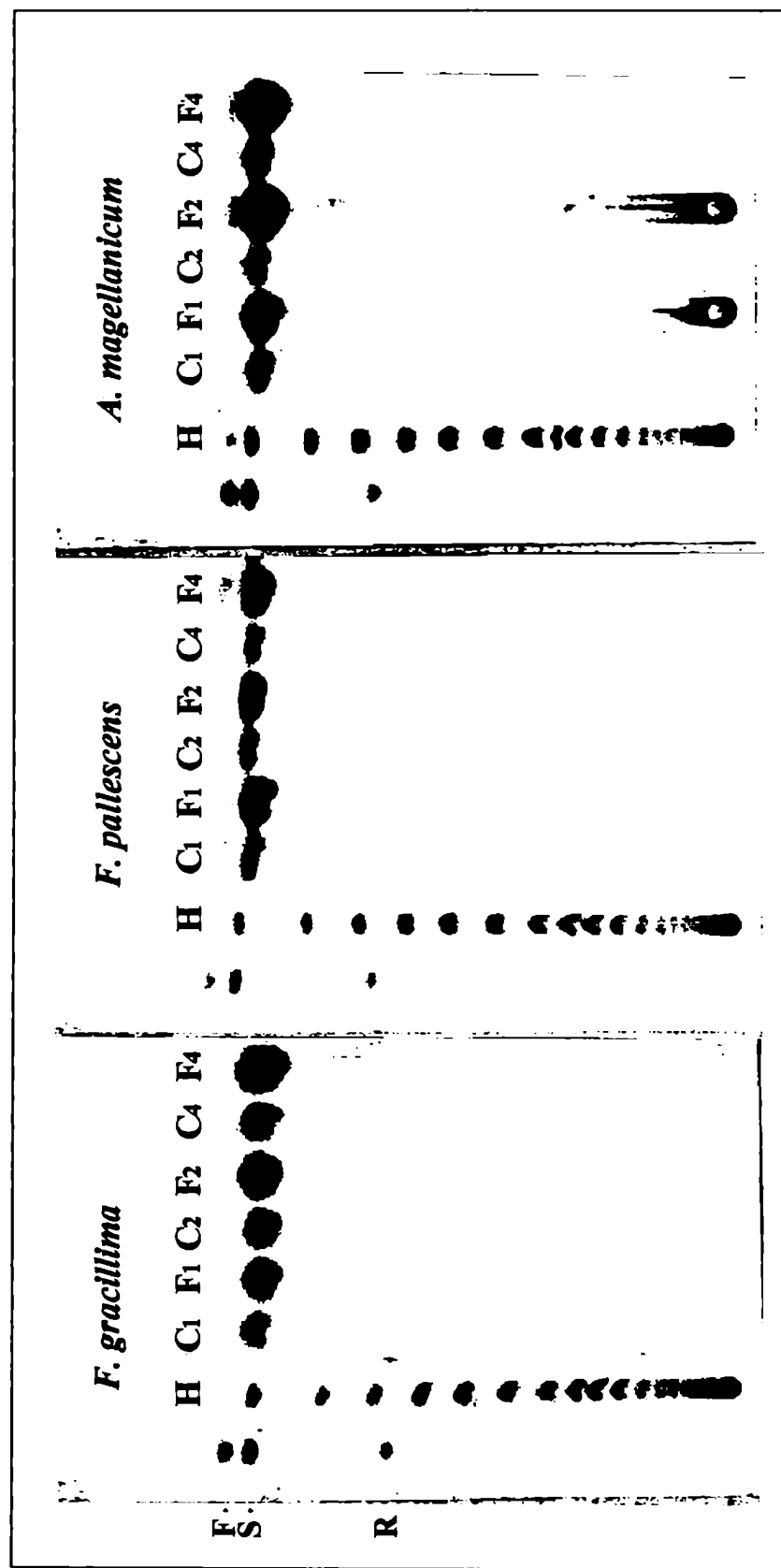
La síntesis de los polímeros de fructosa en las tres especies mostradas comenzó luego de la exposición a bajas temperaturas, aumentando la concentración de los azúcares con los días de estrés.

La cuantificación de estos azúcares por el método de Percheron (1962) mostró el mismo patrón que en las TLC (Figura 7).

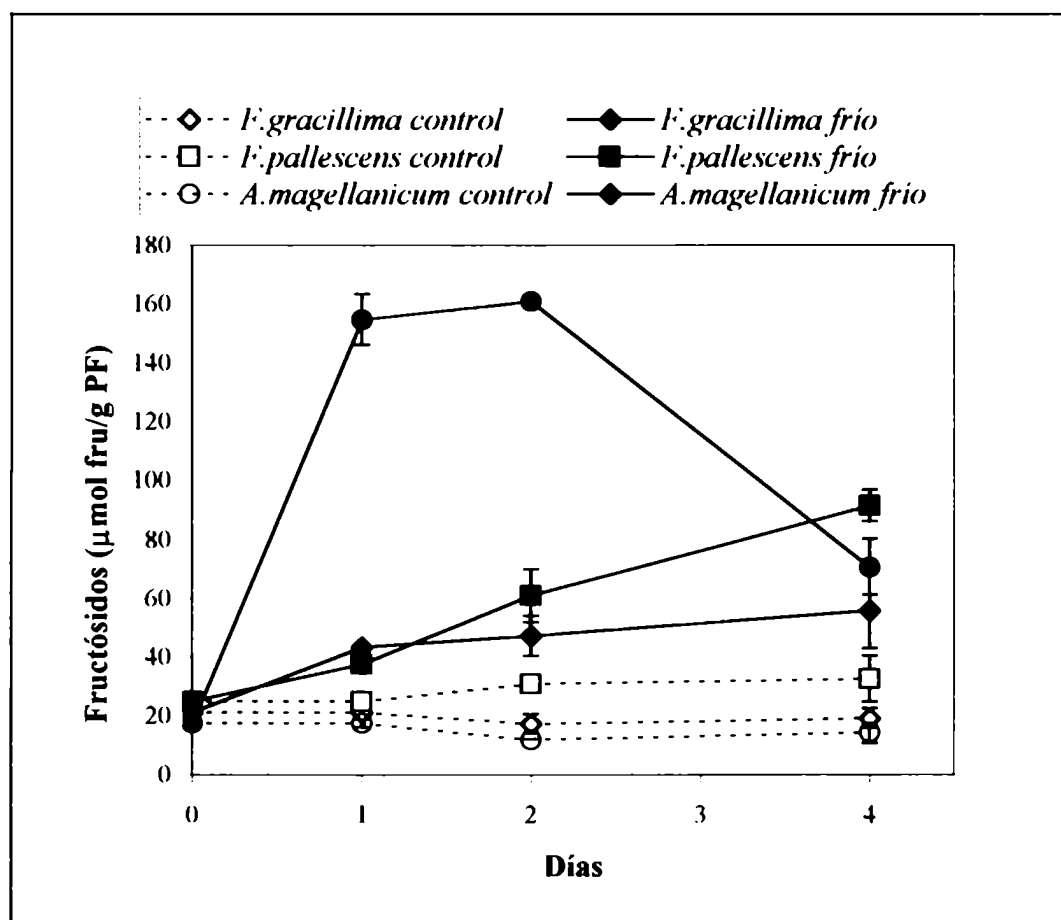
En las especies de *Festuca* el aumento de fructanos se debió, mayoritariamente, a una acumulación de sacarosa, detectándose luego de cuatro días a 4°C sólo trazas de fructanos de bajo GP.

En las hojas de *A. magellanicum* también se observaron aumentos importantes en la concentración de sacarosa durante las bajas temperaturas, pero también se halló la acumulación de polímeros de fructosa, demostrándose la existencia de oligosacáridos de alto GP que se observan en la siembra de la TLC. Esta especie mostró, además, un decrecimiento en la cantidad y tamaño de los fructo-oligosacáridos luego de cuatro días de estrés (Figura 6).





**Figura 6:** Cromatografía en capa delgada de fructanos de hojas de plantas de *Festuca gracillima*, *Festuca pallescens* y *Agropyron magellanicum* tratadas a 4°C. Cada calle contiene fructo-oligosacáridos contenidos en 2 mg de PF. Fructosa, sacarosa, rafinosa (F, S, R, calle 1) y fructanos de *H. tuberosus* (H, calle 2) se usaron como estándares. C, control ; F, frío ; 1, 2, 4, días de frío..



**Figura 7:** Contenido de fructósidos de hojas de plantas de *Festuca gracillima*, *Festuca pallescens* y *Agropyron magellanicum* tratadas a 4°C. Los azúcares solubles conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962).

## 2 – Análisis de los fructo-oligosacáridos de las especies de *Bromus*

### 2.1 – Estrés por bajas temperaturas

*B. auleticus* y *B. pictus* mostraron diferencias significativas en la composición de hidratos de carbono, entre sí y con los patrones encontrados en las anteriores especies patagónicas. Los azúcares solubles conteniendo fructosa de vástagos de ambas especies tratadas con bajas temperaturas fueron analizadas por TLC (Figura 8, calles C y F, control y frío respectivamente).

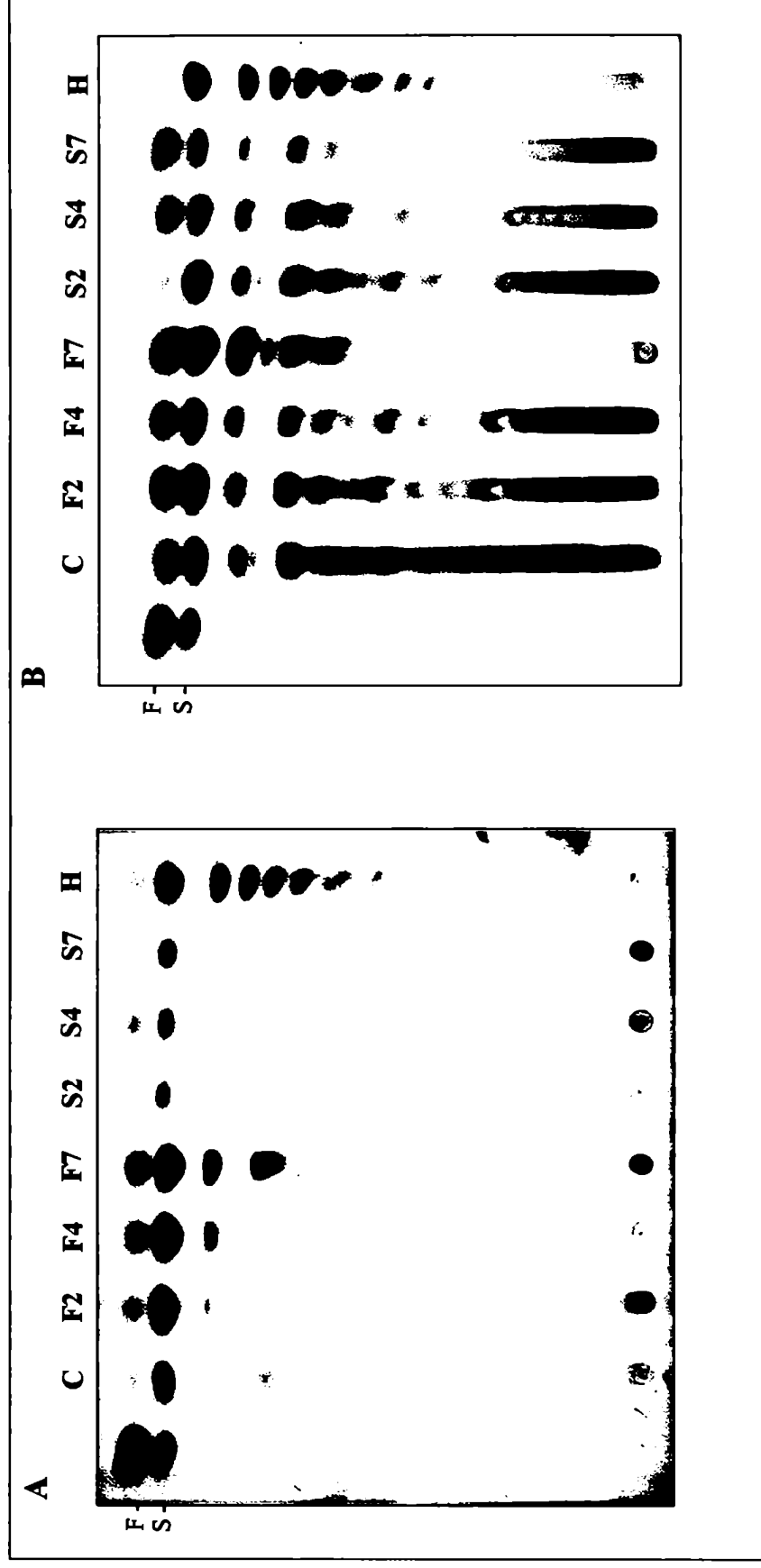
Las plantas de *B. auleticus* crecidas en condiciones control (25°C y riego frecuente) contienen bajos niveles de fructósidos.

En el caso de *B. pictus*, nativa de la Patagonia, la concentración de fructofuranósidos fue mucho mayor, observándose fructanos de GP mayor a 15. Los patrones de azúcares fueron idénticos para la parte aérea y las raíces en ambas especies.

La evidente diferencia encontrada en el nivel total de hidratos de carbono de las plantas control de ambas especies indica que, antes que los tratamientos de frío y sequía fueran ensayados, ambas plantas tenían grandes diferencias en la acumulación de sacarosa y fructanos.

Durante el tratamiento con bajas temperaturas las plantas de *B. pictus* no mostraron diferencias en el contenido de fructósidos totales, observándose el enriquecimiento en el contenido de sacarosa y oligosacáridos de bajo GP, en detrimento de oligosacáridos mayores en el séptimo día de tratamiento. Sin embargo, aunque el patrón de azúcares en el séptimo día se encuentra alterado, el contenido total de fructosa se mantuvo constante.

*B. auleticus* presentó una modificación importante en el contenido de fructanos bajo estrés por frío, según se aprecia por TLC (Figura 8). La sacarosa y los fructanos aumentan paulatinamente con el tiempo de exposición a bajas temperaturas, imitando el tipo de respuesta encontrada para las especies de *Festuca* y *Agropyron*.

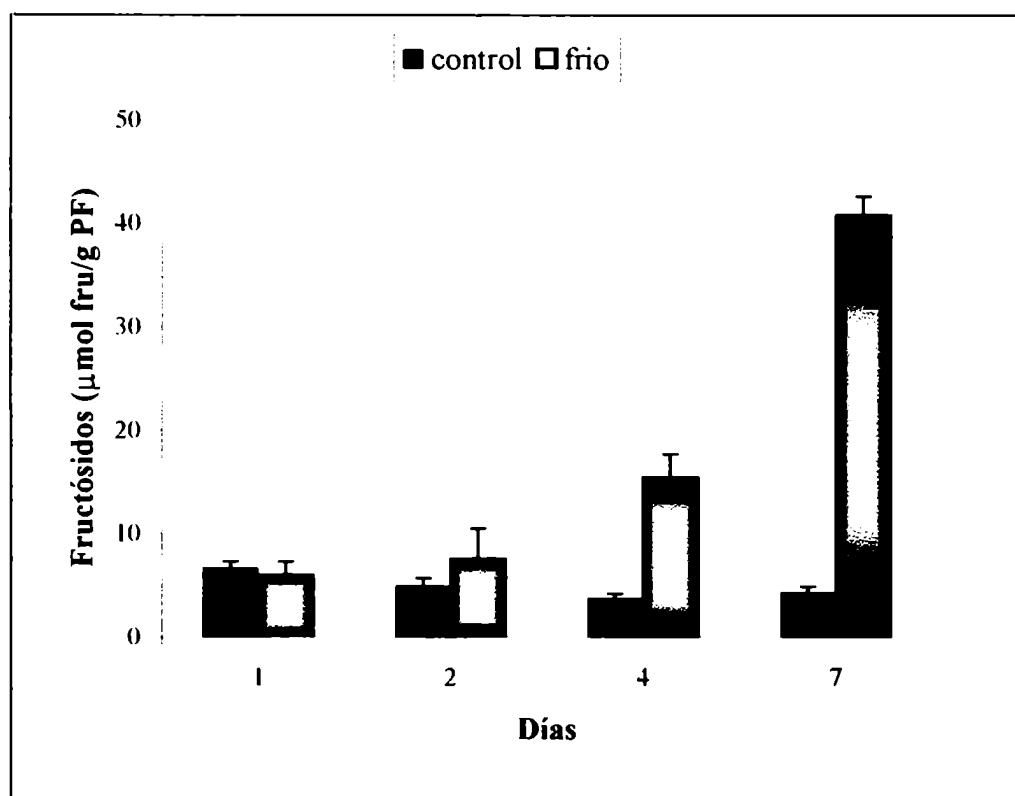


**Figura 8:** Cromatografía en capa delgada de fructanos de vástagos de plantas de *Bromus auleticus* (A) y *Bromus pictus* (B) en diferentes estadios del tratamiento con bajas temperaturas o sequía. En cada calle se sembró el equivalente a 6 mg de PF. Sacarosa, fructosa (S, F, calle 1) y fructanos de *H. tuberosus* (H, calle 9) se usaron como estándares. C, control ; F, frío ; S, sequía ; 2,4,7, días de tratamiento.

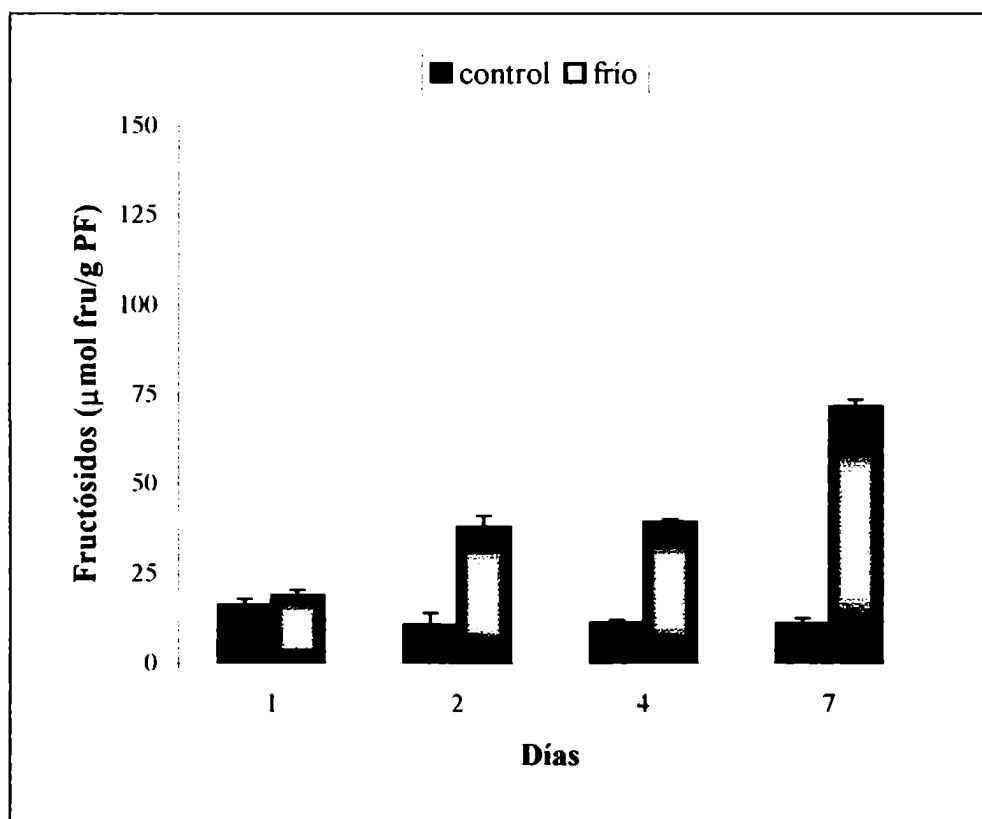
El contenido de fructósidos de raíces y vástagos de *B. auleticus* (Figura 9 y 10) y *B. pictus* (Figura 11 y 12) se cuantificó en las condiciones control y frío por el método de Percheron (1962).

A diferencia de la especie patagónica, *B. auleticus* mostró tanto en raíces como en órganos aéreos un aumento de varias veces en su contenido de fructósidos con respecto a las plantas control. Aunque la concentración de azúcares al final del tratamiento a 4°C fue similar en ambas especies, *B. pictus* mostró concentraciones medias superiores durante todo el período de frío.

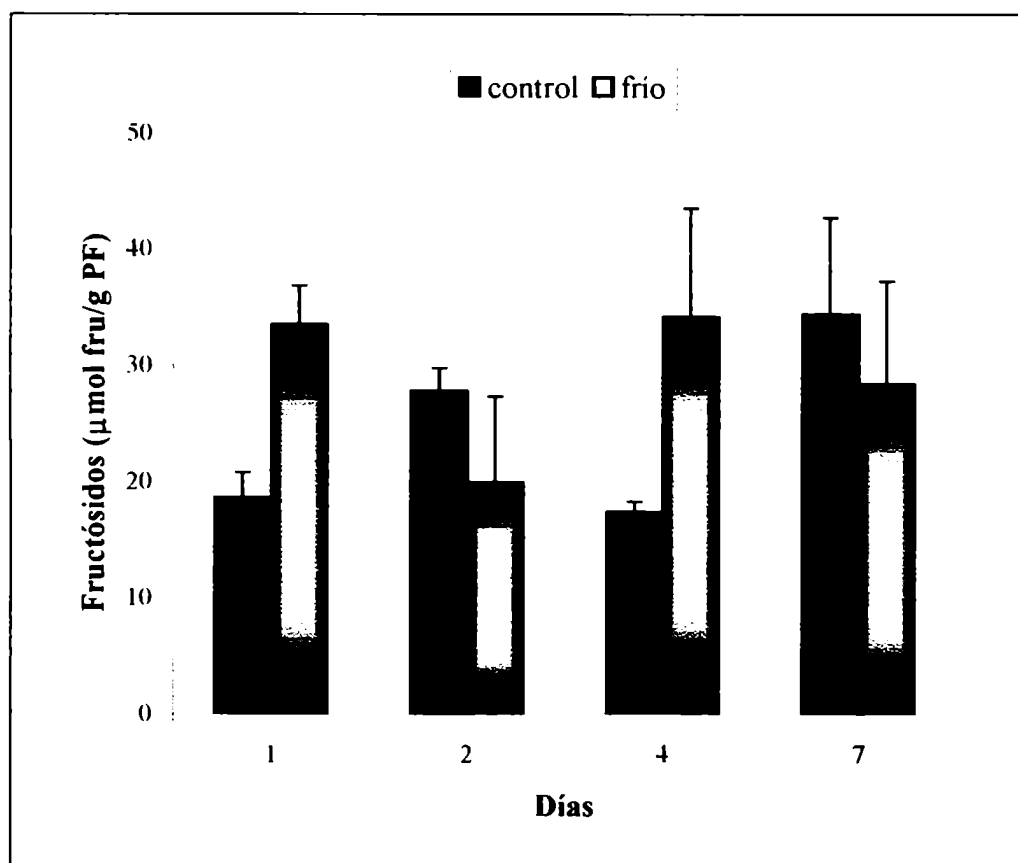
Los altos valores de desviación estándar observados en la especie patagónica, contrastante con las medidas en *B. auleticus*, pueden deberse a que las plantas utilizadas para realizar estos estudios provienen de semillas obtenidas de poblaciones naturales, por lo que esas diferencias reflejarían las variaciones poblacionales existentes en ambas especies.



**Figura 9:** Contenido de fructósidos de raíces de plantas de *Bromus auleticus* tratadas a 4°C. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.

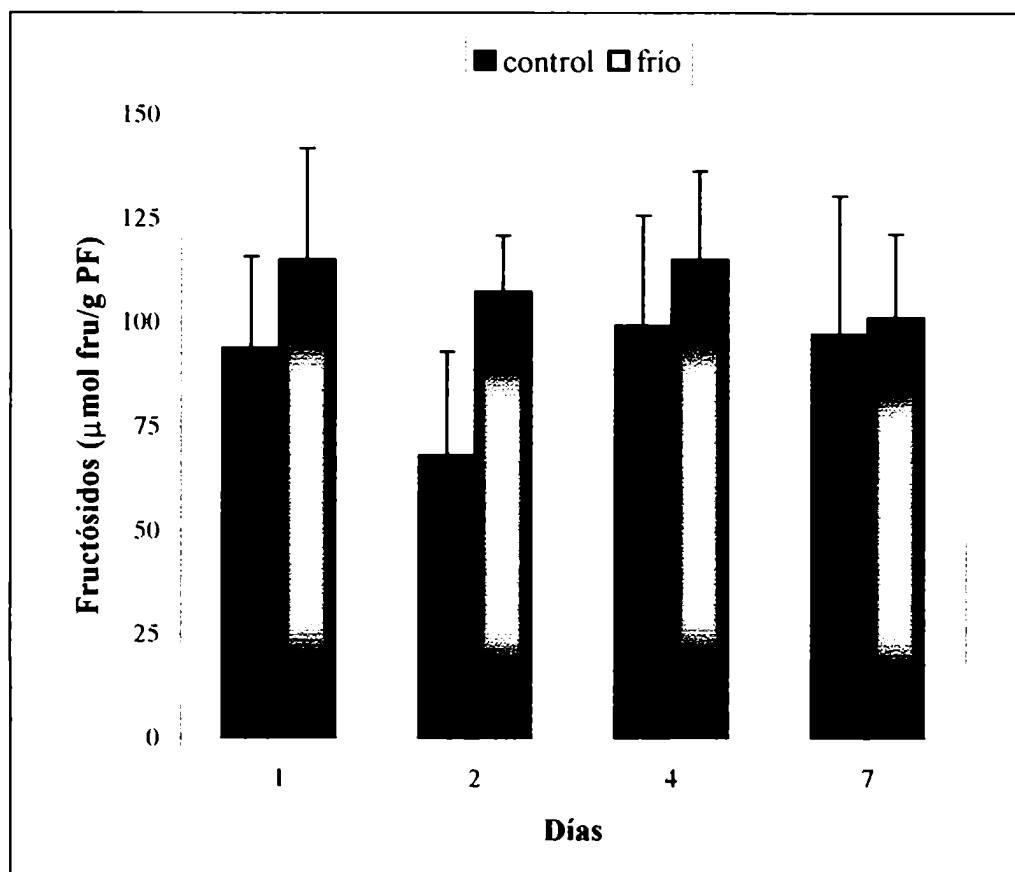


**Figura 10:** Contenido de fructósidos de vástagos de plantas de *Bromus auleticus* tratadas a 4°C. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.



**Figura 11:** Contenido de fructósidos de raíces de plantas de *Bromus pictus* tratadas a 4°C. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.

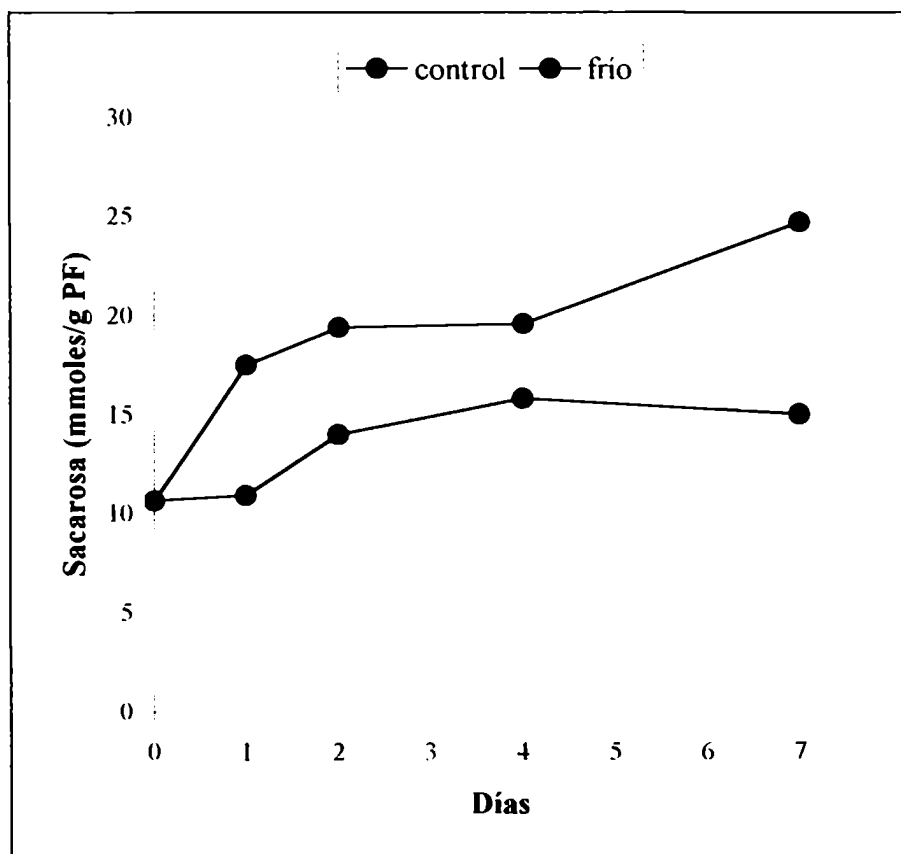




**Figura 12:** Contenido de fructósidos de vástagos de plantas de *Bromus pictus* tratadas a 4°C. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.

Debido al importante aumento de sacarosa observado en la especie patagónica durante el tratamiento con bajas temperaturas, se midieron los niveles de este azúcar en vástagos de *B. pictus* (Figura 13). Esta especie mostró, como se había observado en la TLC (Figura 8), un sensible aumento de sacarosa a partir del primer día del tratamiento a 4°C. Este aumento se mantuvo durante los siete días de bajas temperaturas, llegando a representar el 20% de la fructosa total acumulada en frío (comparar Figuras 12 y 13).

La acumulación de fructanos puede deberse a una redistribución de fotoasimilados por detención del crecimiento. Para evidenciar variaciones en el crecimiento durante el tratamiento con bajas temperaturas, se analizó la evolución del peso seco de vástagos y raíces durante la exposición a 4°C en ambas especies de *Bromus* (Tabla 5). No se observaron diferencias en el PS relativo de controles y plantas tratadas en ninguna de las dos especies.



**Figura 13:** Contenido de sacarosa en vástagos de plantas de *Bromus pictus* sometidas a bajas temperaturas. Los azúcares solubles se separaron por PC, se eluyó la zona de migración de sacarosa y se cuantificó por el método de Percheron (1962).

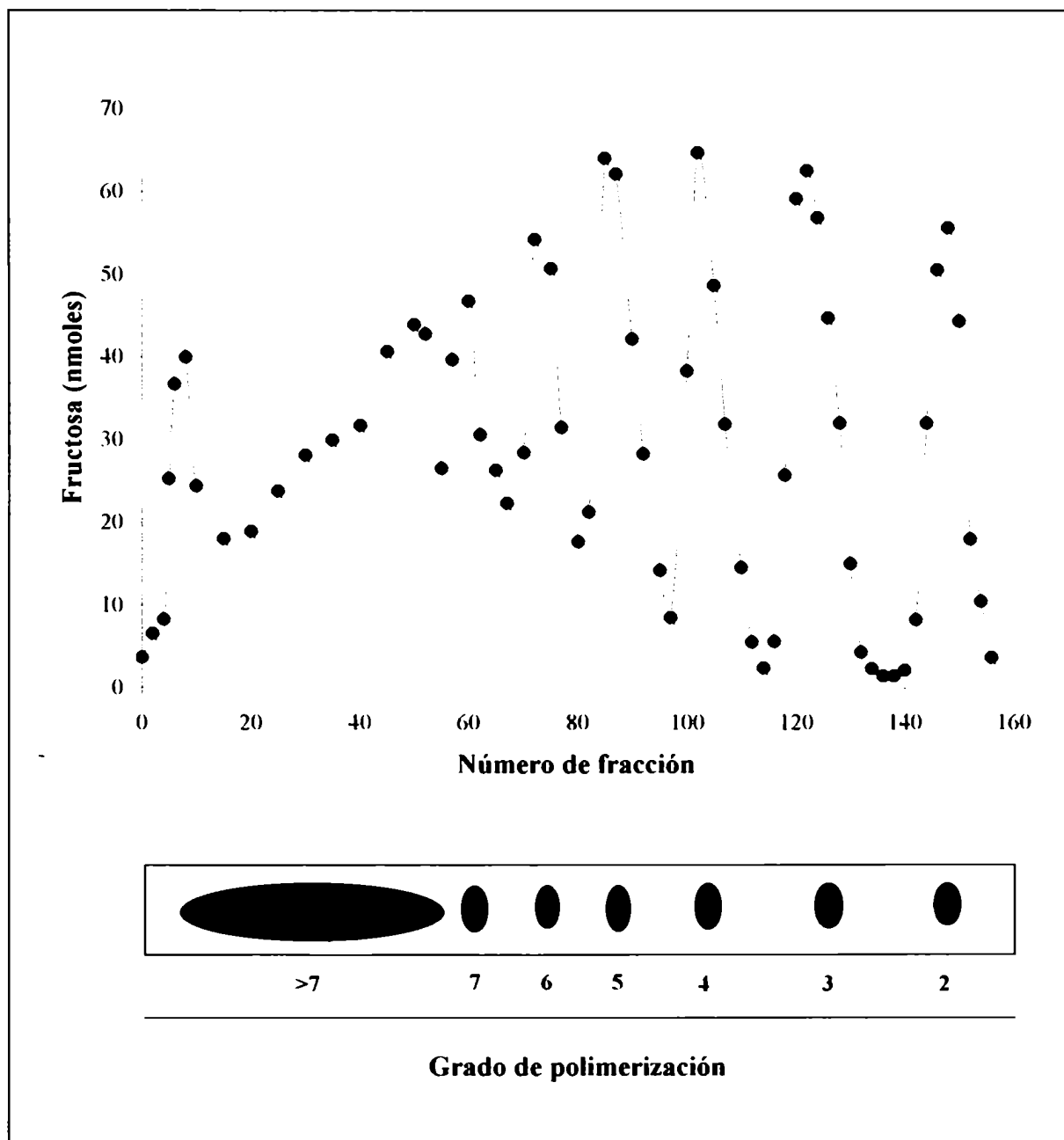
**Tabla 5: Relación %Peso Seco/Peso Fresco en vástagos y raíces de plantas de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* tratadas a 4°C. Los tejidos se liofilizaron o secaron en estufa a 85°C hasta alcanzar peso constante. Los valores están expresados como PS/PF X 100 ± D.E.**

|          |                | <i>Bromus auleticus</i> | <i>Bromus pictus</i> |
|----------|----------------|-------------------------|----------------------|
| Vástagos | Control        | 18,3±1,3                | 23,8±0,8             |
|          | 1 día de frío  | 17,8±0,4                | 22,6±2,1             |
|          | 2 días de frío | 18,0±1,3                | 24,8±1,6             |
|          | 4 días de frío | 19,0±1,9                | 23,6±1,7             |
|          | 7 días de frío | 19,6±1,4                | 24,8±1,5             |
| Raíces   | Control        | 9,3±1,1                 | 11,3±1,1             |
|          | 1 día de frío  | 8,7±1,7                 | 10,8±2,0             |
|          | 2 días de frío | 8,4±1,5                 | 12,4±2,2             |
|          | 4 días de frío | 9,4±1,5                 | 12,9±1,1             |
|          | 7 días de frío | 9,3±1,1                 | 13,2±1,9             |

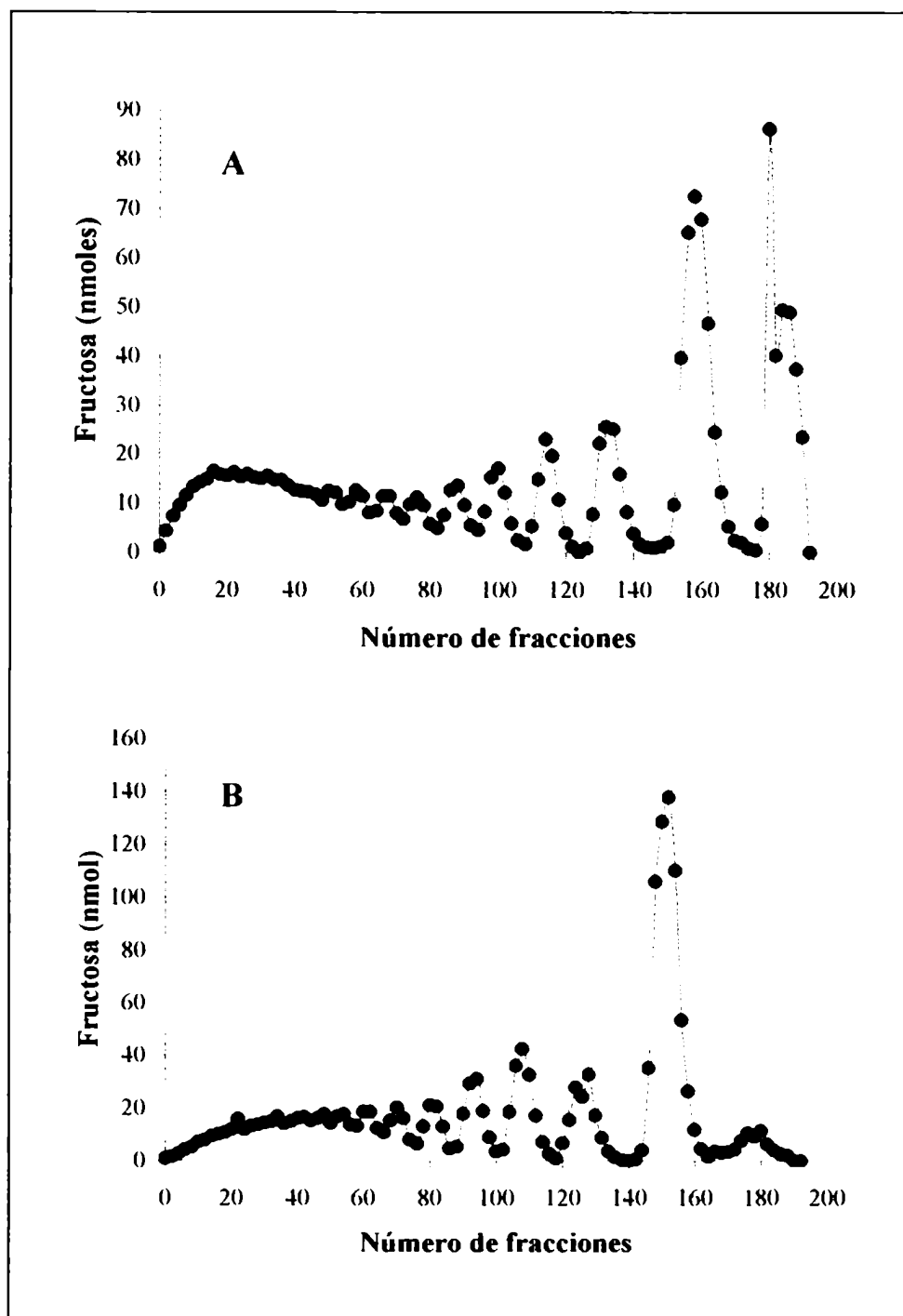
Como se describió anteriormente, la vía de síntesis y degradación de fructanos en Gramíneas es una ruta compleja, formada por varias actividades enzimáticas posibles. El estudio de la estructura molecular de los oligosacáridos puede ayudar a dilucidar las actividades características de cada especie (Livingston III, 1993). Para comparar los patrones de fructo-oligosacáridos de la especie patagónica con los de varias especies acumuladoras de fructanos de composición conocida, se cromatografiaron en columnas de Biogel P2 extractos acuosos de fructanos de *H. tuberosus* (Figura 14). Se comparó el patrón de azúcares, con los obtenidos de vástagos de *Triticum aestivum* var. San Agustín sometidos a 74 días de frío y con los de vástagos de plantas de *B. pictus* mantenidos en condiciones control (Figura 15).

Las fracciones de *H. tuberosus* recolectadas se analizaron por PC y se determinó el grado de pureza de las distintas fracciones. Los fructofuranósidos de GP 2 (sacarosa), 3 (1-kestosa), 4 (nystosa), 5, 6 y 7 lograron separarse eficientemente, no detectándose impurezas de oligosacáridos de distinto GP. Los fructanos de mayor tamaño no se resolvieron bien en la columna, por lo que eluyeron en fracciones que contenían mezclas de distintos oligosacáridos.

Los azúcares de trigo expuesto 74 días a bajas temperaturas dieron un patrón diferente en la cromatografía en Biogel P2. Los picos de azúcares no coincidieron con los encontrados en *H. tuberosus* y cada uno de ellos contuvo más de un oligosacárido, mostrando por lo tanto, la existencia de otros isómeros distintos de los de la serie de las inulinas, típicos de los patrones de Compuestas.



**Figura 14:** Fructanos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* fraccionados por cromatografía de exclusión molecular en Biogel P2. Las fracciones separadas en Biogel P2 se analizaron por PC para determinar la pureza de las fracciones separadas.



**Figura 15:** Fructanos de vástagos de plantas de trigo cv San Agustín (74 días de frío) (A) y de *Bromus pictus* (control) (B) fraccionados por cromatografía de exclusión molecular en Biogel P2.

Los resultados obtenidos con *B. pictus* fueron similares a los encontrados en trigo, con un gran pico de sacarosa y los picos restantes compuestos en general de más de un oligosacárido y cuyas corridas en la cromatografía de exclusión molecular no coincidieron con los fructanos hallados en *H. tuberosus*.

Los azúcares de plantas de *B. auleticus* y *B. pictus*, control y tratadas con bajas temperaturas y las diferentes fracciones separadas por Biogel P2, se analizaron por HPAEC-PAD, con respecto a sus estructuras moleculares.

El análisis cualitativo de los azúcares de vástagos de plantas de ambas especies de *Bromus* mostró diferencias importantes durante el tratamiento con bajas temperaturas (Figura 16), confirmando lo observado por TLC (Figura 8).

*B. auleticus* en condiciones control contiene trazas de oligosacáridos de bajo GP (6-kestosa y bifurcosa), observándose sacarosa y hexosas como azúcares mayoritarios. Luego de exponer las plantas a siete días de bajas temperaturas el patrón de azúcares muestra la aparición de oligosacáridos de GP 11.

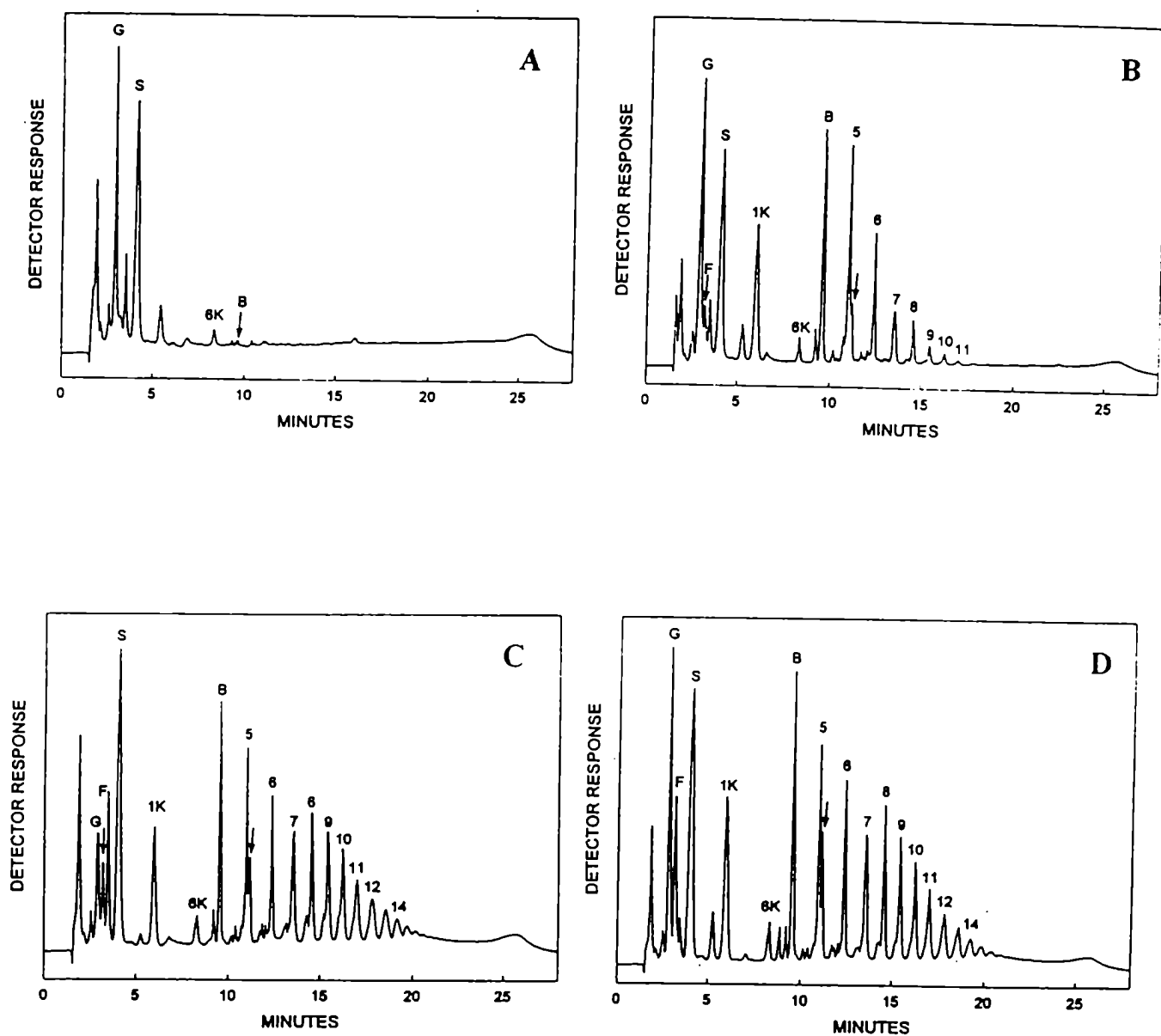
Los vástagos de plantas de *B. pictus* muestran fructanos de alto GP aún en condiciones control, observándose oligosacáridos de hasta GP 16. Durante la exposición a 4°C se mantiene la existencia de fructanos de alto GP, observándose un aumento en el contenido de oligosacáridos menores a expensas de los de mayor GP.

En ambas especies de *Bromus* se observa el mismo patrón de fructanos. La serie derivada de la bifurcosa (1&6 kestotetraosa) es la mejor representada (picos observados en los cromatogramas). Se evidencia además la existencia de otra serie minoritaria (hombros y picos pequeños observados en los gráficos). Estos fructanos corresponderían a oligosacáridos de la serie de la inulinas. Ambas especies contienen las tres isómeros posibles de trisacárido: 1-kestosa, 6-kestosa y neokestosa.

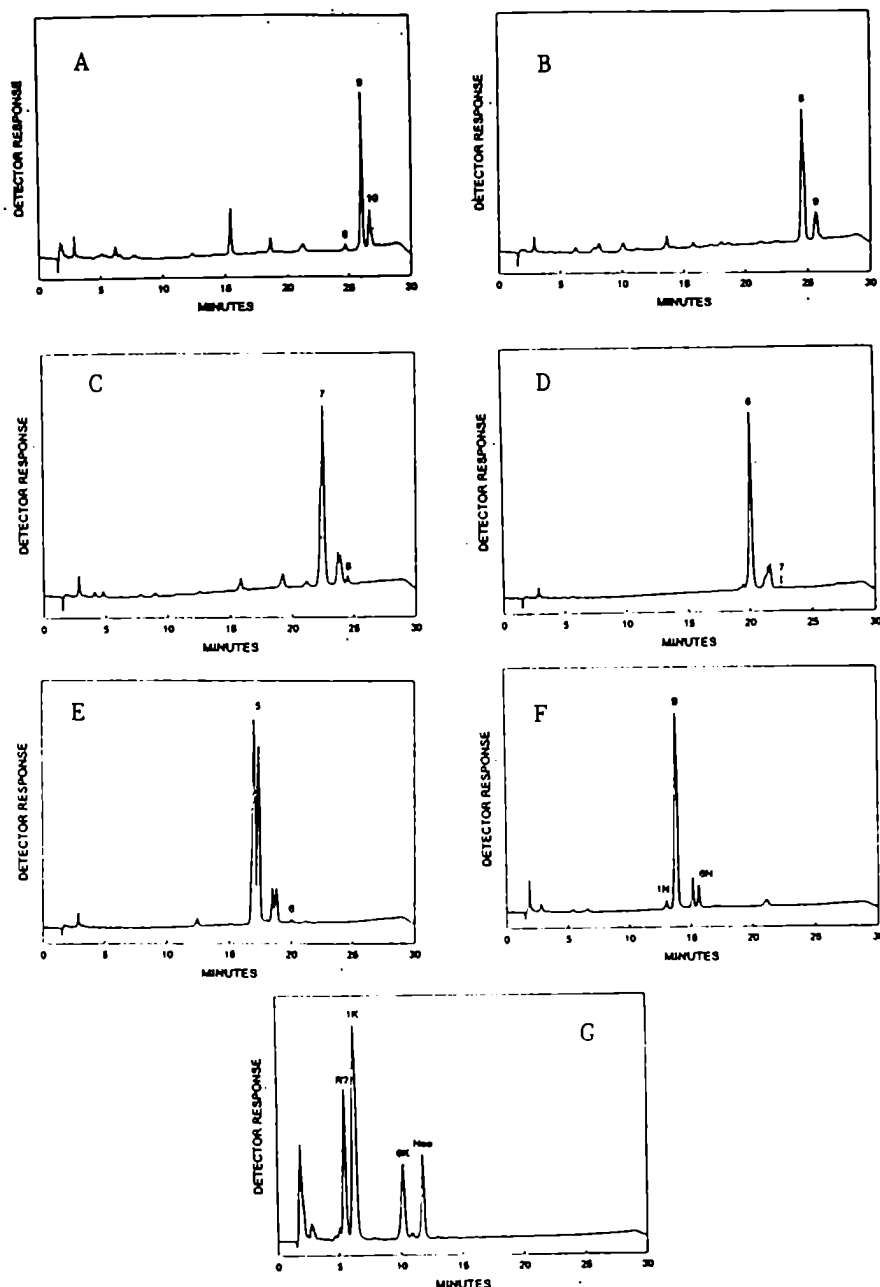
Las fracciones de azúcares de vástagos de *B. pictus* separadas en Biogel P2 mostraron la separación de oligosacáridos de distintos GP cuando fueron analizadas por HPAEC-PAD (Figura 17). La fracción A correspondió a fructanos de GP9, la B a GP 8, la C a GP7, la D a GP6, la E a GP5 y la F a GP 4. Todas estas fracciones mostraron la presencia mayoritaria de isómeros de la serie de la bifurcosa y picos menores correspondientes a otras series. La fracción G contuvo los tres isómeros de trisacáridos y un pico que corrió antes que la 1-



kestosa que coincide con el tiempo de retención de rafinosa (trisacárido formado por glu, fru y gal).



**Figura 16: Análisis cualitativo por HPAEC-PAD de los fructanos de vástagos de plantas de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* expuestas a bajas temperaturas.** Extractos de azúcares solubles de vástagos de plantas mantenidas en condiciones control y expuestas a siete días a 4°C se utilizaron para realizar cromatografías y se compararon con estándares conocidos de oligosacáridos.



**Figura 17:** Análisis cualitativo por HPAEC-PAD de los fructanos de vástagos de plantas de *Bromus pictus* expuestas a bajas temperaturas separados por Biogel P2. Extractos de azúcares solubles de vástagos de plantas expuestas a siete días a 4°C y fraccionados por cromatografía de exclusión molecular en Biogel P2 se utilizaron para realizar cromatografías y se compararon con estándares conocidos de oligosacáridos.

## 2.2 – Estrés por déficit hídrico

Durante su ciclo de vida las plantas de la especie *B. pictus* están expuestas a condiciones extremas de déficit hídrico, además del estrés por bajas temperaturas.

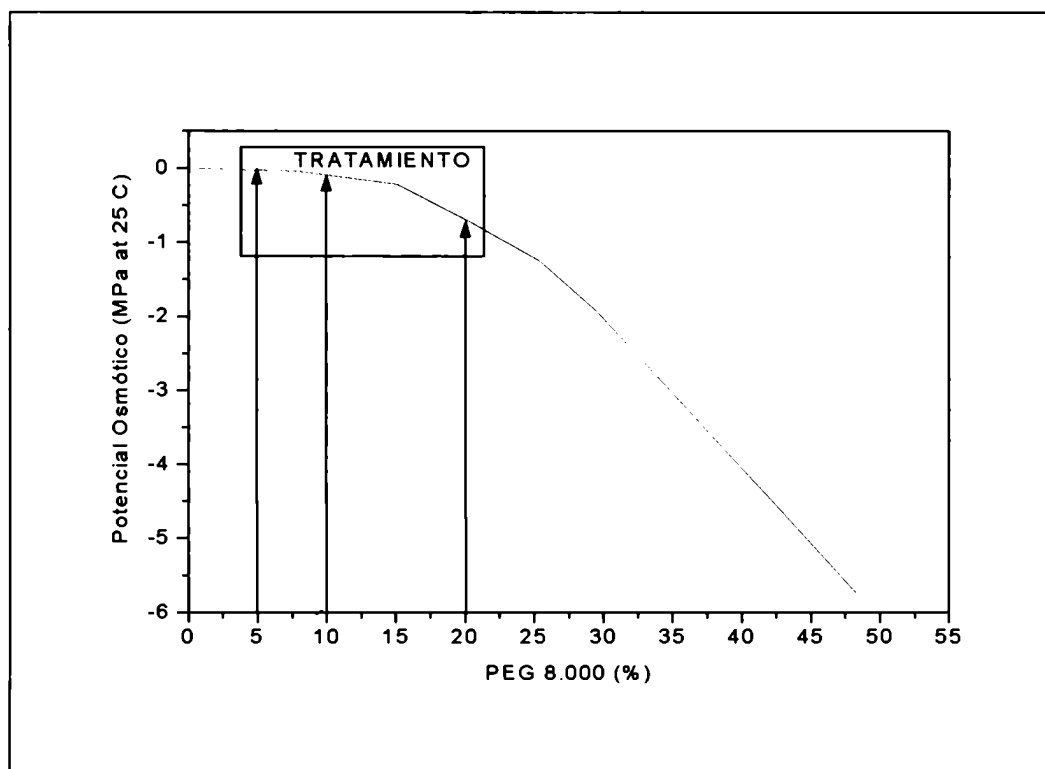
Con el objetivo de ensayar estrés hídrico en plantas de *B. auleticus* y *B. pictus*, se crecieron plantas de ambas especies en condiciones óptimas de riego, luego de lo cual un grupo de macetas se regó con soluciones de PEG 8.000, manteniéndose otro grupo con el riego habitual como control.

El estrés se impuso regando con soluciones de PEG 8.000 en concentraciones crecientes: dos días con PEG 5%, dos días con PEG 10% y tres días con PEG 20%, en un período total de tratamiento de siete días.

Para determinar el grado de sequía ensayado mediante el riego con PEG 8.000, se determinaron los  $\Psi_0$  de soluciones en distintas concentraciones (Figura 18).

El tratamiento gradual con PEG 8.000 corresponde a un estrés hídrico leve, si se lo compara con las condiciones encontradas en la región de distribución de *B. pictus*, donde el potencial agua llega a alcanzar  $-8$  MPa.

Para evaluar el impacto del tratamiento de sequía ensayado se midió el estatus hídrico de plantas de ambas especies de *Bromus* en respuesta a la sequía ensayada con PEG por medio del contenido relativo de agua (CRA) en la lámina de las primeras hojas desarrolladas de plantas control y expuestas a déficit hídrico (Tabla 6). El CRA de ambas especies se modificó luego del tratamiento con la máxima concentración de PEG (20%).



**Figura 18:** Potencial agua de soluciones de PEG 8.000 en concentraciones crecientes. El recuadro indica las condiciones de déficit hídrico ensayadas en el presente trabajo en plantas de *B. auleticus* y *B. pictus*.

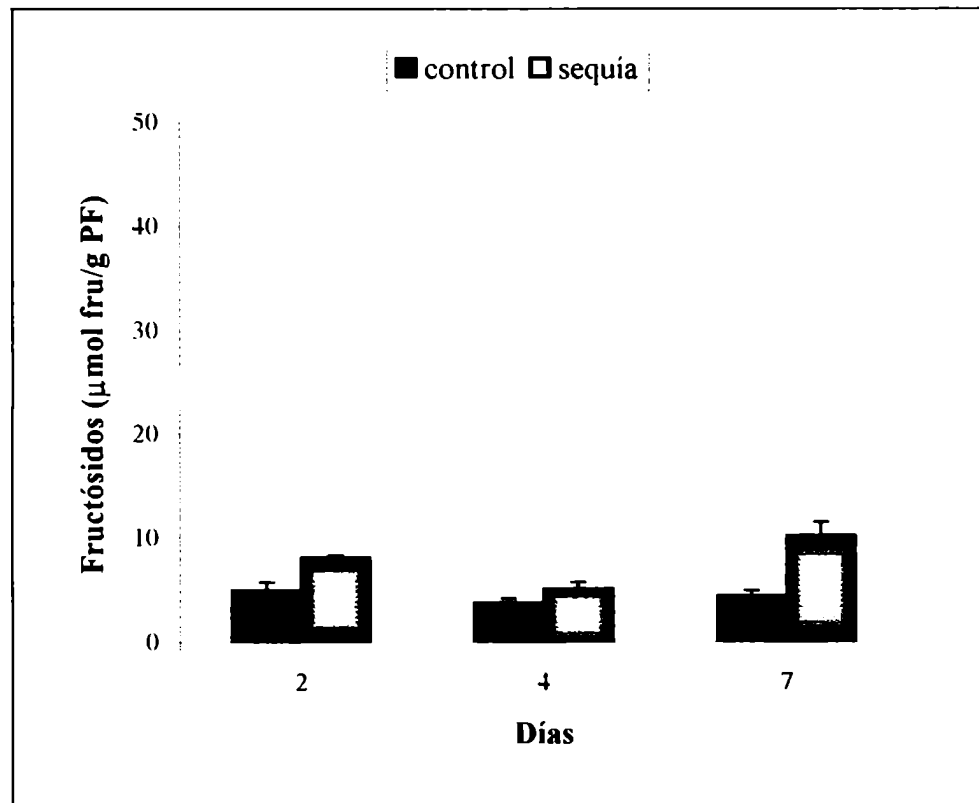
**Tabla 6:** Contenido relativo de agua en las hojas de plantas de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* sometidas a estrés hídrico con PEG 8.000. El CRA se midió en la primeras hoja expandida como  $PF - PS / PT - PS \times 100 \pm D.E.$

| Especie             | CONTROL<br>día |      |      | SEQUIA<br>día |      |       |
|---------------------|----------------|------|------|---------------|------|-------|
|                     | 2              | 4    | 7    | 2             | 4    | 7     |
| <i>B. auleticus</i> | 95±1           | 95±2 | 96±1 | 93±2          | 96±1 | 77±11 |
| <i>B. pictus</i>    | 96±3           | 95±3 | 94±4 | 92±2          | 96±1 | 82±3  |

Se analizaron los azúcares solubles que contienen fructosa, por medio de TLC de raíces y vástagos de plantas de ambas especies de *Bromus* expuestas a sequía (ver Figura 8). El déficit hídrico no modificó los patrones observados en los controles en ninguna de las dos especies.

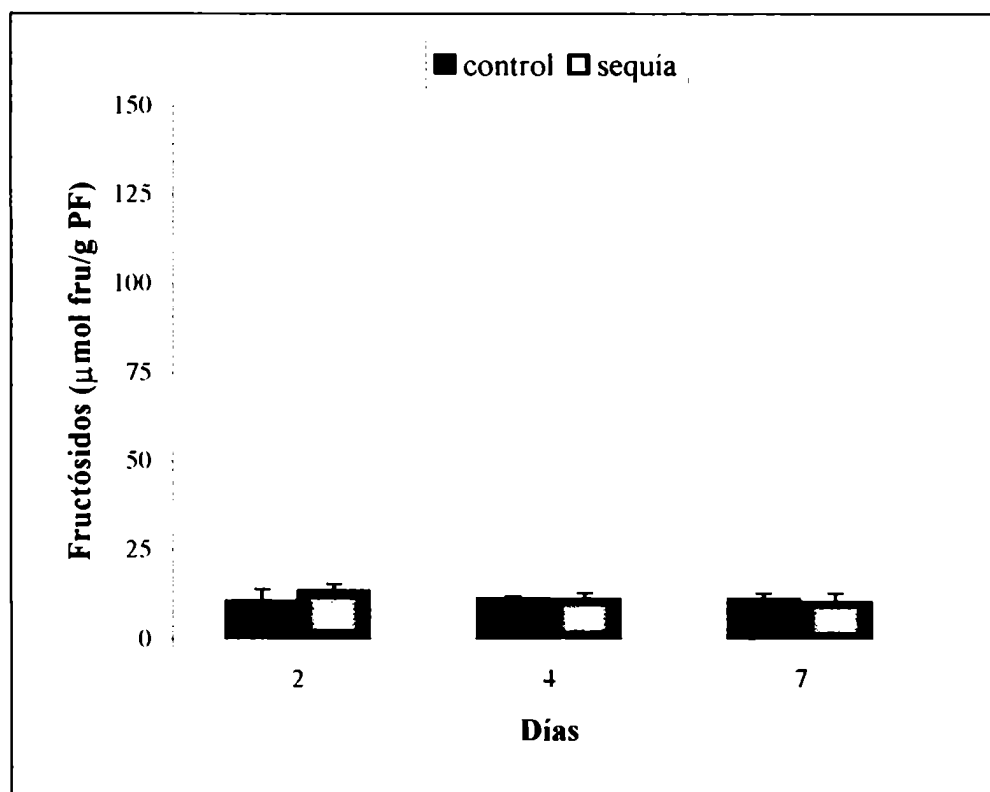
El contenido de fructofuranósidos se cuantificó en los tejidos de plantas de *B. auleticus* y *B. pictus* (Figuras 19 a 22). Las diferencias observadas a nivel de azúcares entre plantas de ambas especies volvieron a evidenciarse en el tratamiento con PEG, encontrando en *B. pictus* un alto contenido de fructanos y en *B. auleticus* sólo trazas de oligosacáridos. Sin embargo durante el tratamiento con PEG 8.000 no se modificaron los niveles de fructósidos, ni en raíces ni en vástagos con respecto a los controles con riego óptimo.

Las diferencias observadas en el último días de tratamiento con PEG en las raíces de *B. auleticus* (Figura 19) se debe solamente a que el contenido de agua en estos tejidos es menor en las plantas tratadas que en los controles (ver Tabla 6).

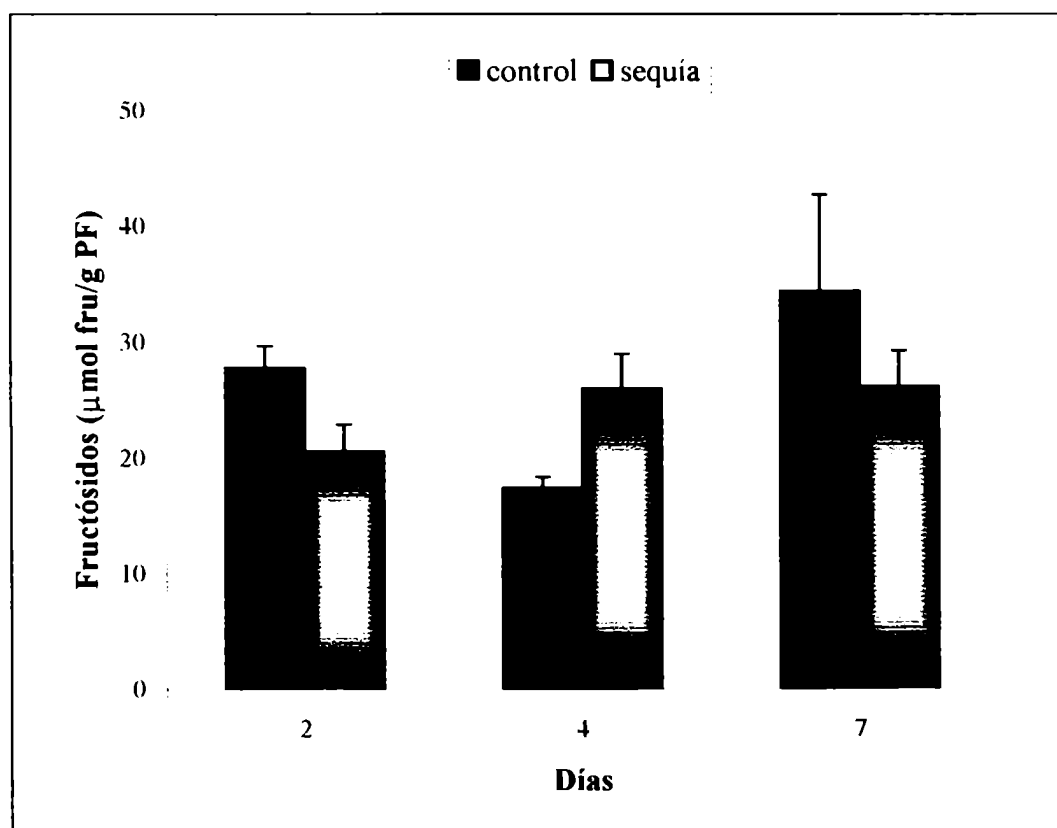


**Figura 19:** Contenido de fructósidos de raíces de plantas de *Bromus auleticus* tratadas con PEG 8.000. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.

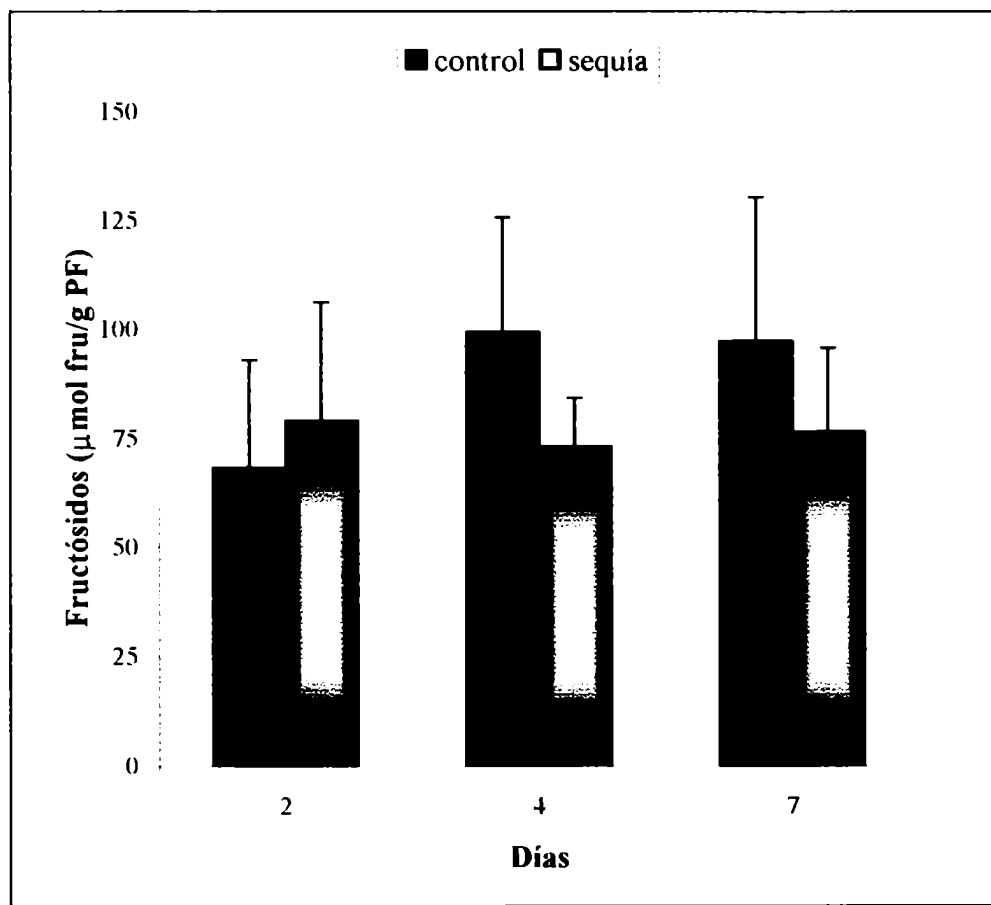




**Figura 20:** Contenido de fructósidos de vástagos de plantas de *Bromus auleticus* tratadas con PEG 8.000. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.



**Figura 21:** Contenido de fructósidos de raíces de plantas de *Bromus pictus* tratadas con PEG 8.000. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.



**Figura 22:** Contenido de fructósidos de vástagos de plantas de *Bromus pictus* tratadas con PEG 8.000. Los azúcares conteniendo fructosa se cuantificaron por el método de Percheron (1962). Los resultados son el promedio de al menos tres repeticiones independientes.

### 3 – Análisis de las enzimas del metabolismo de sacarosa

#### 3.1 – Estrés por frío

El metabolismo de fructanos está directamente relacionado con las concentraciones de sacarosa en la célula vegetal. En ambas especies de *Bromus* se observaron aumentos importantes en la concentración de sacarosa durante el tratamiento con bajas temperaturas, por lo que se analizaron las actividades de las enzimas asociadas al metabolismo de este hidrato de carbono. Se ensayaron las actividades SS, SPS e INV con extractos crudos de vástagos y raíces de plantas de *Bauleticus* y *B. pictus* tratadas a 4°C (Tabla 7). La actividad SPS se ensayó en condiciones de Vmáxima. La SS se midió en sentido de síntesis de sacarosa. Los resultados muestran poca variación en las actividades SS, SPS e INV bajo las condiciones ensayadas entre plantas expuestas a 4°C y plantas mantenidas a la temperatura de crecimiento.

Para observar los niveles de proteína de la SS y SPS se midieron los niveles de estas enzimas por inmunoensayos utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-SS y anti-SPS de arroz preparados en el laboratorio sin observarse diferencias en la cantidad de proteína SS y SPS durante el tratamiento con bajas temperaturas.

**Tabla 7: Actividades de las enzimas del metabolismo de sacarosa en vástagos de plantas de *Bromus* sometidas a bajas temperaturas.** Las enzimas SS y SPS se midieron por formación de sacarosa (nmoles sacarosa/ $\mu$ g de proteína/h), analizadas por el método de Percheron (1962). La actividad INV se midió cuantificando azúcares reductores (nmol/ $\mu$ g de proteína/h) por el método de Somogyi-Nelson (Spiro, 1966).

| Especie                     | Enzima<br>(nmol/ $\mu$ g<br>prot./h) | CONTROL |      |     |      | FRIO |     |     |     |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------|------|-----|------|------|-----|-----|-----|
|                             |                                      | Días    |      |     |      | Días |     |     |     |
|                             |                                      | 1       | 2    | 4   | 7    | 1    | 2   | 4   | 7   |
| <i>Bromus<br/>auleticus</i> | SS                                   | 1,9     | 1,9  | 1,5 | 1,7  | 2,1  | 1,1 | 1,3 | 1,6 |
|                             | SPS                                  | 1,0     | 0,7  | 1,0 | 1,2  | 1,0  | 0,7 | 0,6 | 1,2 |
|                             | INV                                  | 9,2     | 13,5 | 8,0 | 10,7 | 11,8 | 9,2 | 9,5 | 7,8 |
| <i>Bromus<br/>pictus</i>    | SS                                   | 0,7     | 0,5  | 0,6 | 0,7  | 0,7  | 0,8 | 0,5 | 0,5 |
|                             | SPS                                  | 1,0     | 0,8  | 0,6 | 0,9  | 0,6  | 0,8 | 0,5 | 0,8 |
|                             | INV                                  | 3,6     | 3,8  | 5,3 | 5,4  | 3,7  | 5,0 | 3,0 | 5,0 |

### **3.2 – Estrés por déficit hídrico**

Las plantas tratadas con PEG 8.000 no mostraron diferencias en las actividades de las enzimas del metabolismo de sacarosa (SPS, SS e INV) con respecto a los controles. Tampoco se observaron diferencias en cuanto a la actividad SST. Estos resultados coinciden con lo observado en la TLC, con respecto a los patrones de azúcares.

#### 4 – Análisis del metabolismo de fructanos en plantas de *Bromus* sometidas a estrés por bajas temperaturas

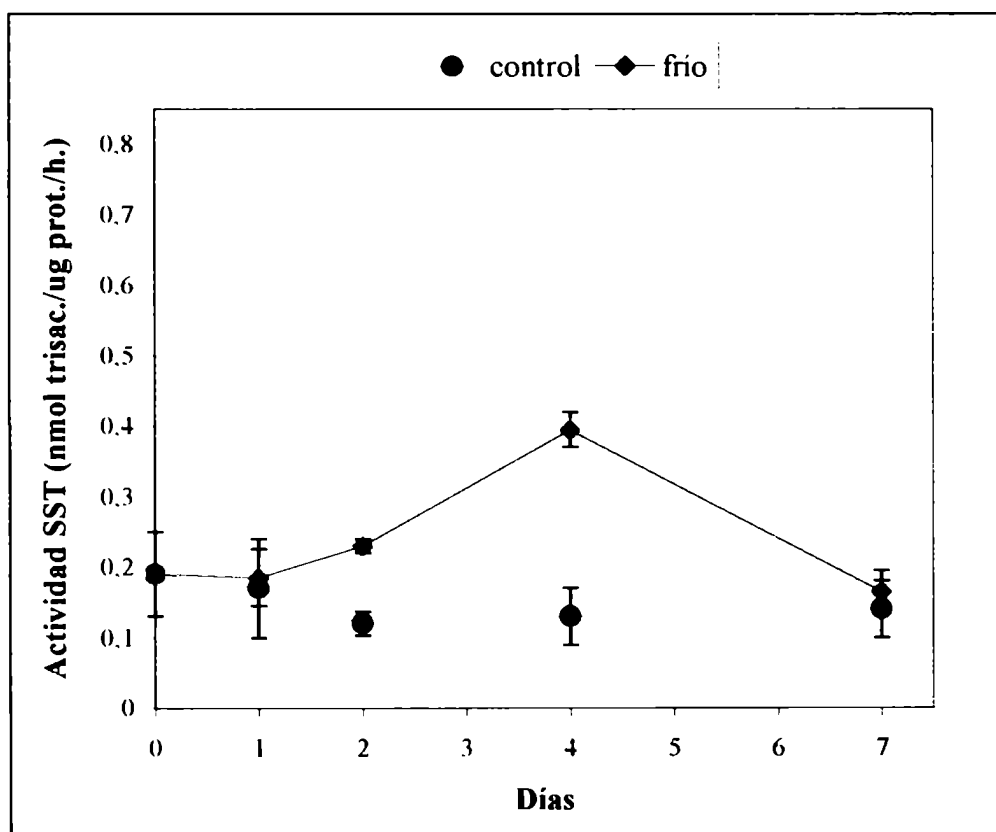
La actividad SST en distintas especies ha demostrado ser lineal durante horas e incluso días de incubación utilizando extractos crudos y fracciones purificadas (Cairns y Ashton, 1994; Shiomi, 1979). En el caso de las especies de *Bromus* la actividad ensayada a 30 y 37°C mostró mantenerse lineal más allá de las 4 h de incubación, por lo que todos los experimentos posteriores se realizaron con incubaciones de hasta 4 h. La linealidad de la actividad no pareció verse afectada por las altas actividades INV encontradas en los extractos.

La evolución de la actividad SST durante la exposición a bajas temperaturas sobre cero también mostró diferencias importantes en ambas especies de *Bromus* (Figuras 23 y 24).

*B. pictus* tuvo mayores niveles de actividad SST durante todo el período de exposición a bajas temperaturas, aumentando más de dos veces los niveles de actividad durante el primer día e incrementos de más de tres veces al final del tratamiento. Esta situación se ve reflejada en el importante incremento de trisacárido observado en el séptimo día a 4°C en la especie patagónica (Figura 8).

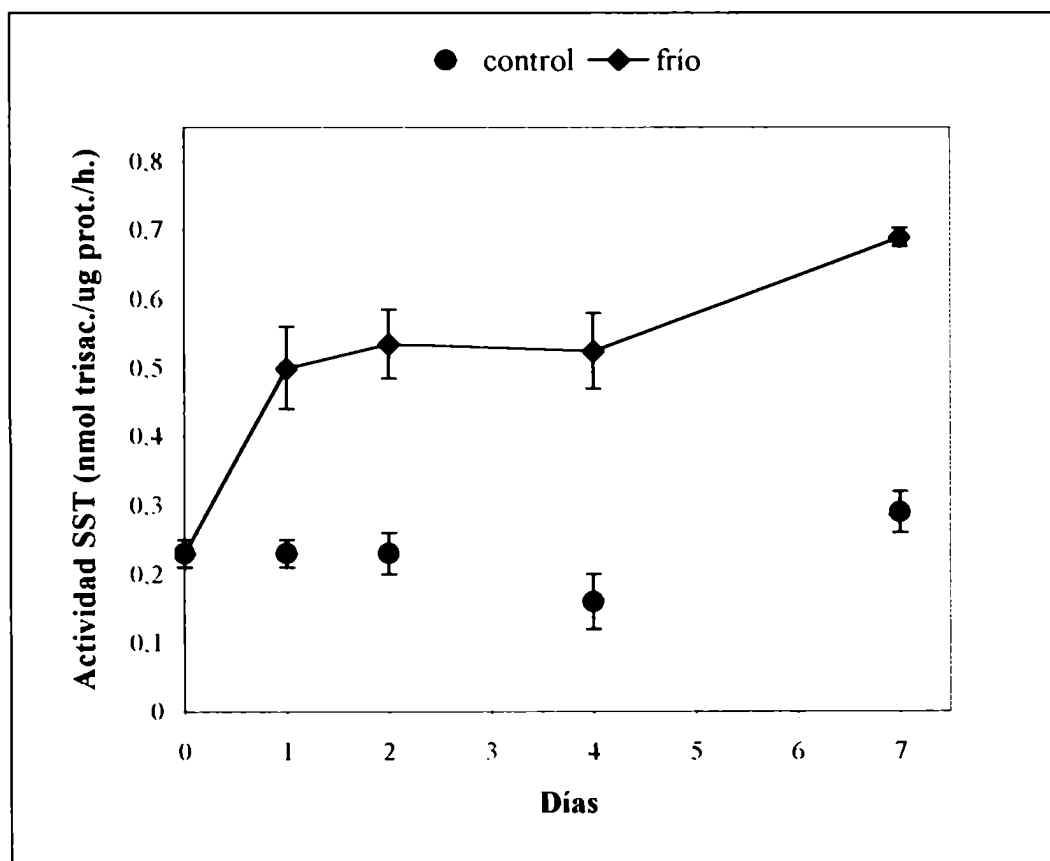
Como ya se ha demostrado, los niveles de fructofuranósidos totales no sufren cambios importantes durante el estrés por frío, pero se observan cambios en las proporciones de los distintos oligosacáridos, con la depolimerización de fructanos mayores y el incremento de trisacárido y sacarosa observado por TLC (Figura 8). El incremento de 1-kestosa se encontraría asociado a los altos niveles de actividad SST encontrados en la especie patagónica.

*B. auleticus* aumentó la actividad durante los primeros días de exposición a frío, para luego decrecer a los niveles de los controles.



**Figura 23:** Actividad SST en vástagos de plantas de *Bromus auleticus* expuestas a bajas temperaturas. Se cuantificó el trisacárido separado por PC, formado luego de la incubación con [ $^{14}\text{C}$ ] sacarosa.





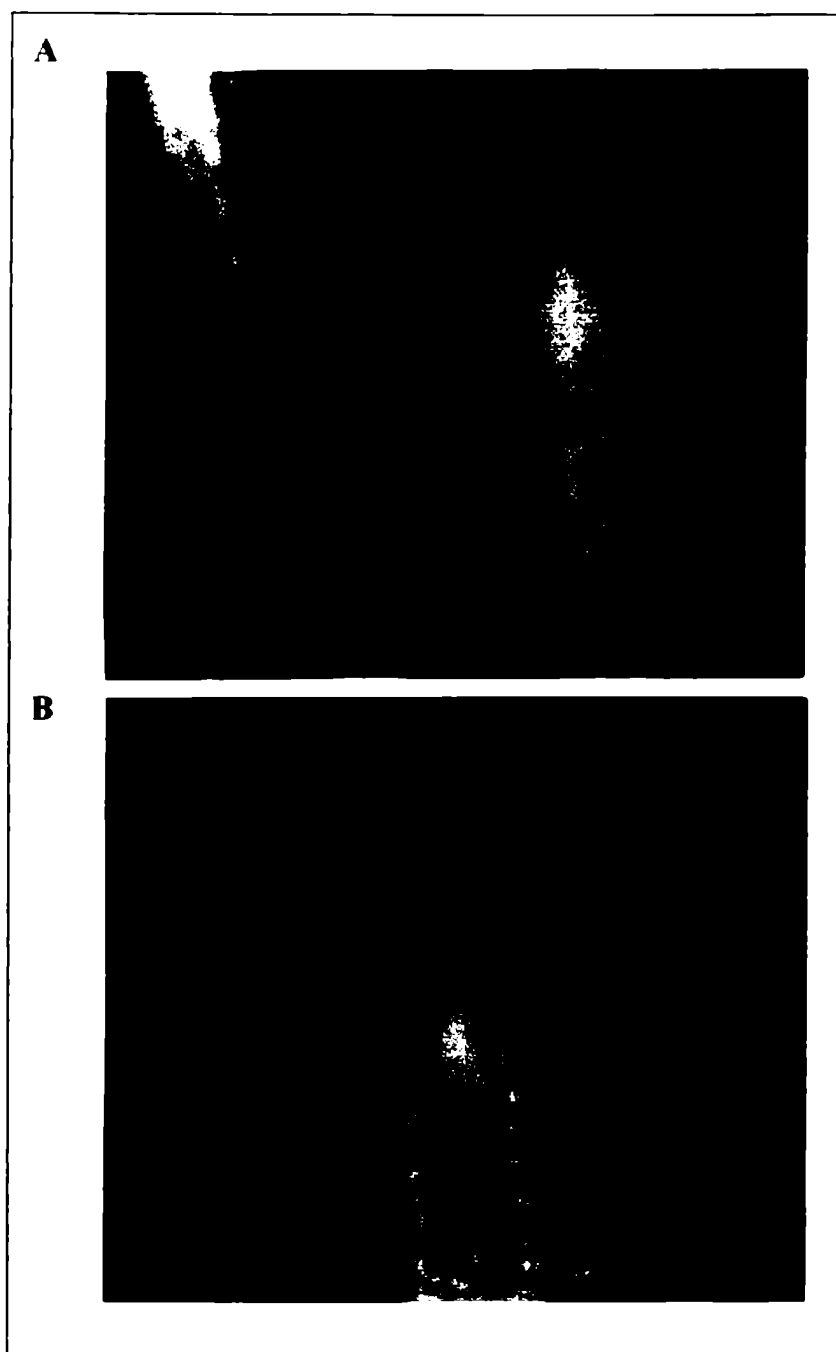
**Figura 24:** Actividad SST en vástagos de plantas de *Bromus pictus* expuestas a bajas temperaturas. Se cuantificó el trisacárido separado por PC, formado luego de la incubación con [ $^{14}\text{C}$ ] sacarosa.

## 5 – Estudios de viabilidad celular

Para analizar el daño celular causado por el tratamiento con PEG 8.000, se incubaron raíces de *B. auleticus* y *B. pictus* con soluciones de yoduro de propidio. Este compuesto fluoresce sólo cuando se encuentra en contacto con el ADN celular, por lo que es necesario que la membrana del núcleo se encuentre dañada para unirse al ADN y emitir fluorescencia que se detecta observando núcleos rojizos por microscopia de fluorescencia. Por tanto este fluorocromo es un indicador útil de mortalidad celular. Este fluorocromo ha podido utilizarse particularmente en raíces, ya que el tejido es incoloro y no existe interferencia con otros pigmentos que tienen autofluorescencia o que fluorescen en las condiciones de observación. El ensayo de viabilidad celular con bromuro de propidio no pudo ser realizado en los tejidos verdes de las plantas por estas razones.

Las siguientes fotografías muestran ápices de las dos especies y su aspecto luego de siete días de tratamiento con PEG 8.000 (Figura 25).

Las observaciones microscópicas de raíces de las dos especies de *Bromus* estudiadas mostraron que los ápices están diferentemente afectados por la sequía. Luego de siete días de tratamiento con PEG 8.000 el 50% de los ápices de las raíces de *B. pictus* contenían células muertas, mientras que en las mismas condiciones el 95% de los ápices de *B. auleticus* mostraban células con núcleos rojos, evidencia de mortalidad celular.



**Figura 25:** Viabilidad celular de ápices de raíces de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* expuestas a déficit hídrico con PEG 8.000. Las raíces de plantas control y tratadas siete días con PEG de ambas especies se incubaron con yoduro de propidio y se observaron por microscopía de fluorescencia. Los tejidos con células de núcleos rojos corresponden a células muertas.

A, raíz de *B. auleticus* y B, raíz de *B. pictus*, expuestas a siete días de tratamiento con PEG, tratadas con yoduro de propidio y observadas en microscopio de epifluorescencia. Aumento: A, 100 X; B, 200 X.

## 6 – Estudios de la actividad SST de *Bromus pictus*

A partir del hallazgo de altas actividades SST en los vástagos de *B. pictus* en respuesta al estrés por frío, se propuso estudiar las características bioquímicas de la enzima. La presencia de altas actividades de INV ácida en los extractos crudos dificultó el estudio directo de los parámetros de la enzima, por lo cual se intentó la purificación parcial de la misma a fin de obtener fracciones con baja actividad INV.

La metodología utilizada para medir actividad SST en extractos crudos (medición de la actividad con sacarosa radiactiva como sustrato, seguida de cromatografía en papel, fraccionamiento y medición de radiactividad de las fracciones en contador de centelleo) resulta ser inadecuada para intentar un esquema de purificación de proteínas. Otros métodos más adecuados utilizando HPAEC-PAD han sido usados en recientes trabajos (Koops y Jonker, 1994, 1996; Sprenger y col., 1995; Van den Ende y col., 1996; Lüscher y col, 1996), no hallándose disponible en el laboratorio para el presente estudio.

### 6.1 – Desarrollo de un método enzimático para el ensayo de la actividad SST

Con el objetivo de obtener un método rápido de ensayo de la actividad SST, compatible con los tiempos utilizados en la purificación de enzimas, se desarrolló un método enzimático acoplado a la determinación directa de trisacárido mediante un método colorimétrico.

El procedimiento desarrollado consta de dos incubaciones sucesivas. En la primera, se mide actividad SST por incubaciones con sacarosa, en la segunda, la sacarosa remanente es hidrolizada por una sacarasa específica, seguida de destrucción de los monosacáridos producido por calentamiento con alcali. Luego, la fructosilsacarosa es medida directamente por el método de Percheron (1962).

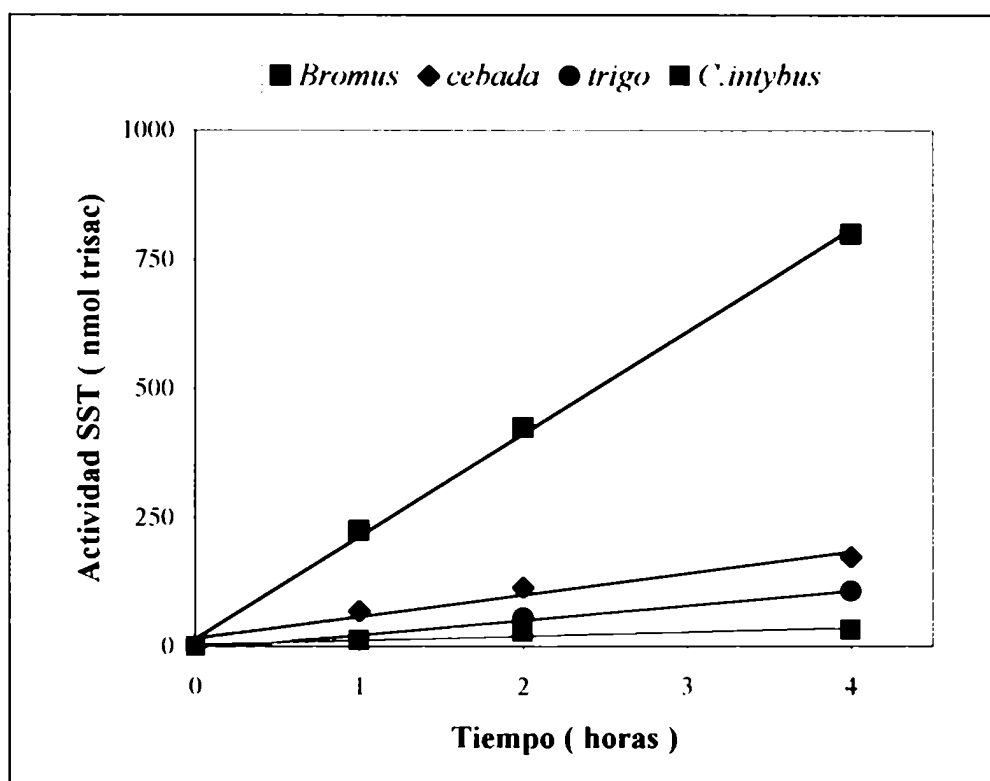
La aplicabilidad del método se ensayó por determinación de actividad SST en relación con el tiempo de incubación a 30°C (Figura 26) y con la cantidad de proteína (Figura 27) en extractos de varias especies vegetales.

Se comparó el presente método enzimático con la determinación de la actividad SST de los mismos extractos por el método radiactivo, utilizado anteriormente para la cuantificación de la actividad (Tabla 8).

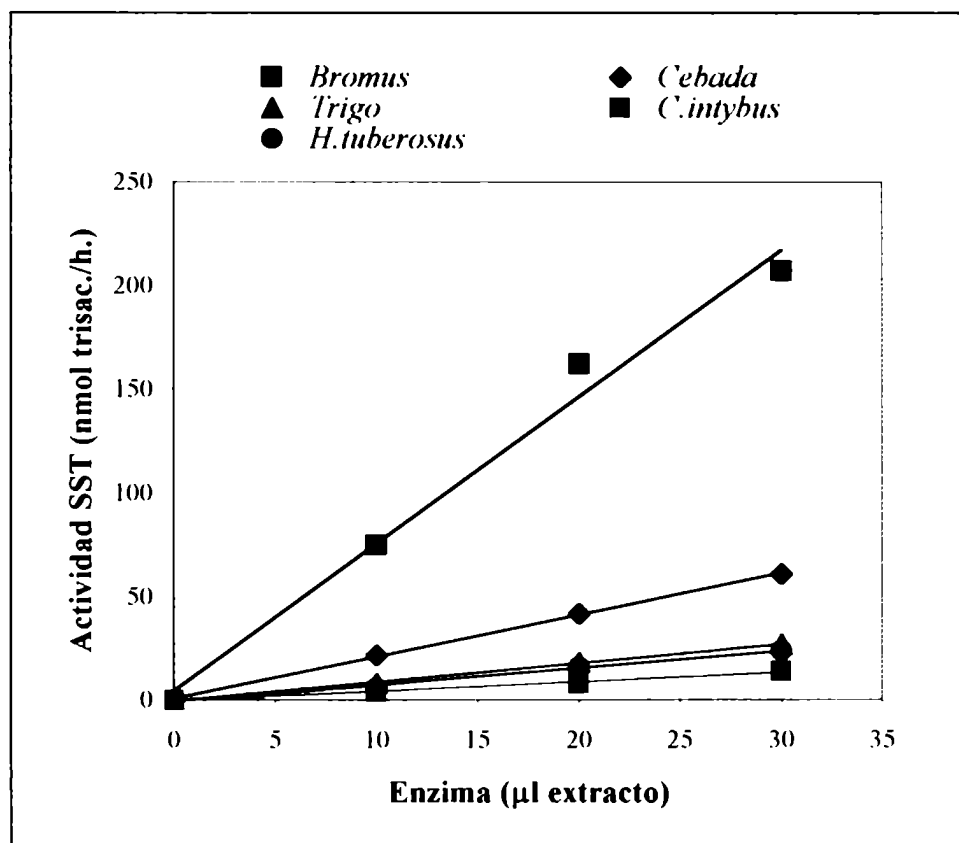
**Tabla 8: Comparación de la actividad SST medido con el nuevo método enzimático y el método radiactivo.** Se utilizaron extractos de *B. pictus* y *Hordeum vulgare* para ensayar la actividad SST con distintas cantidades de enzima.

| Extractos | <i>Bromus pictus</i>       |             | <i>Hordeum vulgare</i> |             |
|-----------|----------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| Proteicos |                            |             |                        |             |
| METODO    |                            |             |                        |             |
|           | Colorimétrico              | Radioactivo | Colorimétrico          | Radioactivo |
| μl        | fructosilsacarosa (nmoles) |             |                        |             |
| 10        | 75±8                       | 87±7        | 22±3                   | 19±2        |
| 20        | 162±14                     | 148±14      | ND                     | ND          |
| 30        | 207±19                     | 183±19      | 61±8                   | 56±7        |

ND: No determinado.



**Figura 26:** Medición de la actividad SST en relación al tiempo de incubación a 30°C en varias especies vegetales que contienen fructanos. Se utilizaron extractos de *B. pictus*, cebada, trigo y *C.intybus* para realizar estudios de actividad SST en relación al tiempo de incubación a 30°C. Las incubaciones se realizaron con 30 µl de extracto de cada especie.



**Figura 27:** Medición de la actividad SST en relación a los niveles de proteína en varias especies vegetales que contienen fructanos. Se utilizaron extractos de *B. pictus*, trigo, *H. tuberosus*, cebada y *C. intybus* para relizar estudios de actividad SST en relación al contenido de proteína.

## 6.2 – Purificación de la actividad SST de *Bromus pictus*

Usando este método para la medición de actividad SST, se ensayaron protocolos de purificación de proteínas para intentar obtener extractos enzimáticos con baja actividad de INV.

La actividad sacarosa-sacarosa fructosil transferasa en *B. pictus* probablemente esté formada por la actividad de dos enzimas, que según el modelo propuesto para la síntesis de trisacáridos en Gramíneas (Figura 4) corresponderían a la actividad 1-SST que sintetiza 1-kestosa y a la actividad 6-SFT que en presencia de sacarosa como único sustrato sintetizaría 6-kestosa. Las técnicas disponibles en el laboratorio no permiten cuantificar los dos trisacáridos por separado, por lo que las dos actividades propuestas en Gramíneas para la formación de trisacáridos no pueden ser discriminadas utilizando la metodología utilizada en este trabajo y serán llamadas en conjunto actividad SST.

En una primera etapa se utilizó poco material vegetal (50 g) para poner a punto los diferentes pasos del protocolo de purificación. Las extracciones de proteínas solubles del material vegetal se realizaron de vástagos de plantas tratadas siete días con bajas temperaturas, debido a que en *B. pictus* éste era el tiempo de tratamiento que mostraba mayor actividad SST. Paralelamente se siguió la actividad de INV ácida.

Los extractos crudos se precipitaron con sulfato de amonio, ensayándose varios cortes de la sal hasta optimizar la precipitación de la mayor parte de la actividad SST. Los precipitados fueron dializados y utilizados para ensayar distintos tipos de pasos cromatográficos: Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel, MonoQ), Cromatografía de afinidad (Concanavalina A-Sepharose), Cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenyl-Sepharose).

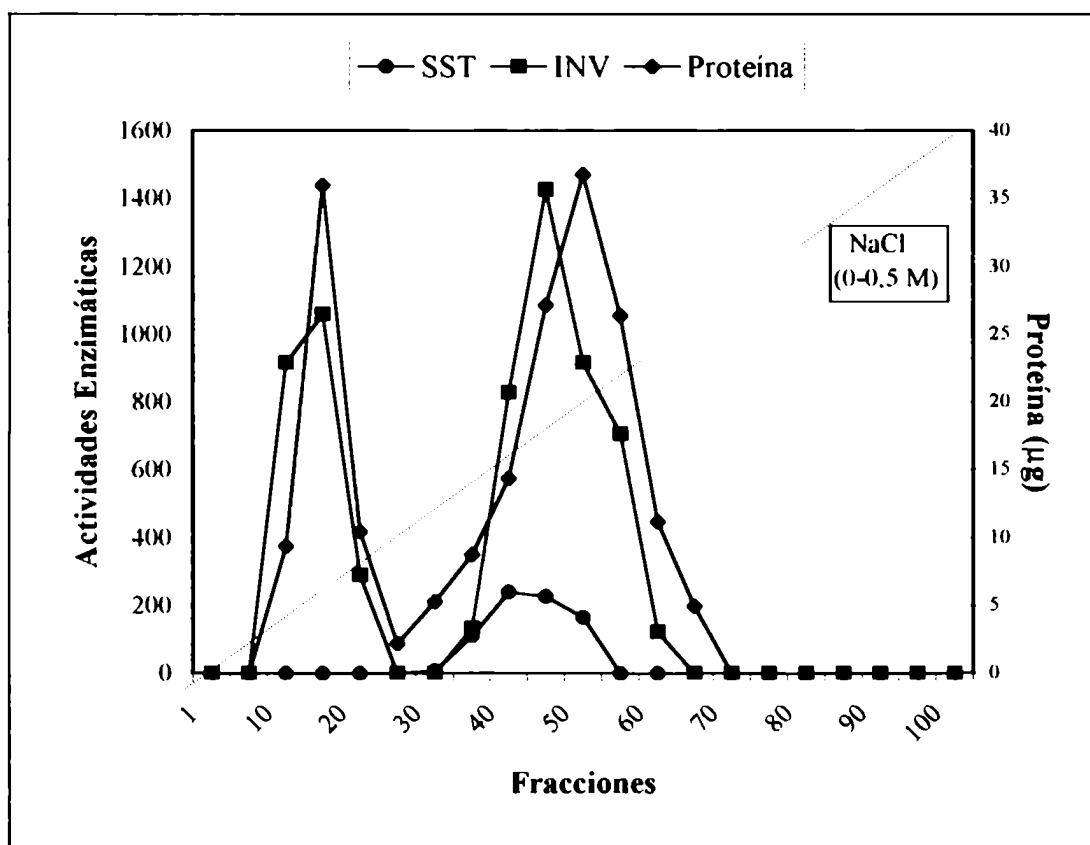
Se ensayaron cromatografías de afinidad con Concanavalin A-Sepharose, ya que esta técnica se ha utilizado ampliamente en los protocolos de purificación de glicoproteínas y en especial en la purificación de INV y enzimas del metabolismo de fructanos (Koops y Jonker, 1994, 1996; Lüscher y col., 1996; St John y col., 1997; Van den ende y col., 1996).

Los mejores resultados en la separación de las actividades SST e INV se lograron utilizando el siguiente esquema de purificación:

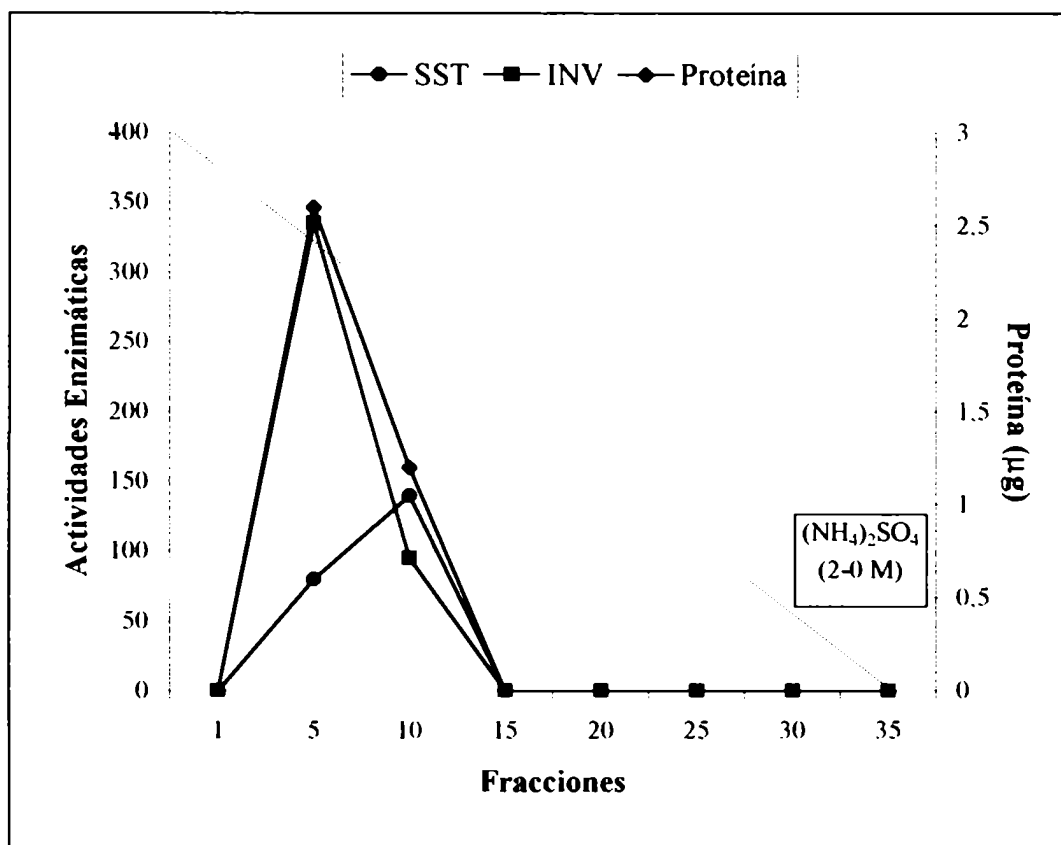
- Obtención del extracto crudo.
- Precipitación con sulfato de amonio (30-60%).



- Cromatografía de intercambio aniónico: columna de DEAE-Sephacel (Figura 28).
- Cromatografía de interacción hidrofóbica: columna de Phenyl-Sepharose (Figura 29).



**Figura 28:** Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharcel de extractos de vástagos de plantas de *Bromus pictus* expuestas siete días a 4°C. Para la cromatografía se utilizaron extractos precipitados previamente con sulfato de amonio y dializados. Las proteínas se eluyeron en un gradiente lineal de cloruro de sodio 0-0,5 M. La actividad SST se cuantificó como nmol de trisacárido/h y la actividad INV como nmol de sacarosa hidrolizada/ h, utilizando 30 µl de cada fracción proteica.



**Figura 29: Cromatografía de interacción hidrofóbica en Phenyl-Sepharose de fracciones purificadas por DEAE-Sephacel.** Las fracciones con alta actividad SST y baja actividad INV purificadas por precipitación con sulfato de amino, diálisis y DEAE-Sephacel se cromatografiaron en Phenyl-Sepharose. Las proteínas se eluyeron en un gradiente lineal de sulfato de amonio 2-0 M. La actividad SST se cuantificó como nmol de trisacárido/h y la actividad INV como nmol de sacarosa hidrolizada/ h, utilizando 30 µl de cada fracción proteica.

Las actividades enzimáticas se midieron como nanomoles de trisacárido formado en una hora de incubación a 30°C (SST) y como nanomoles de sacarosa hidrolizada en las mismas condiciones (INV). Los productos y la cantidad de proteína se midieron por tubo de reacción usando 35µl de cada fracción proteica.

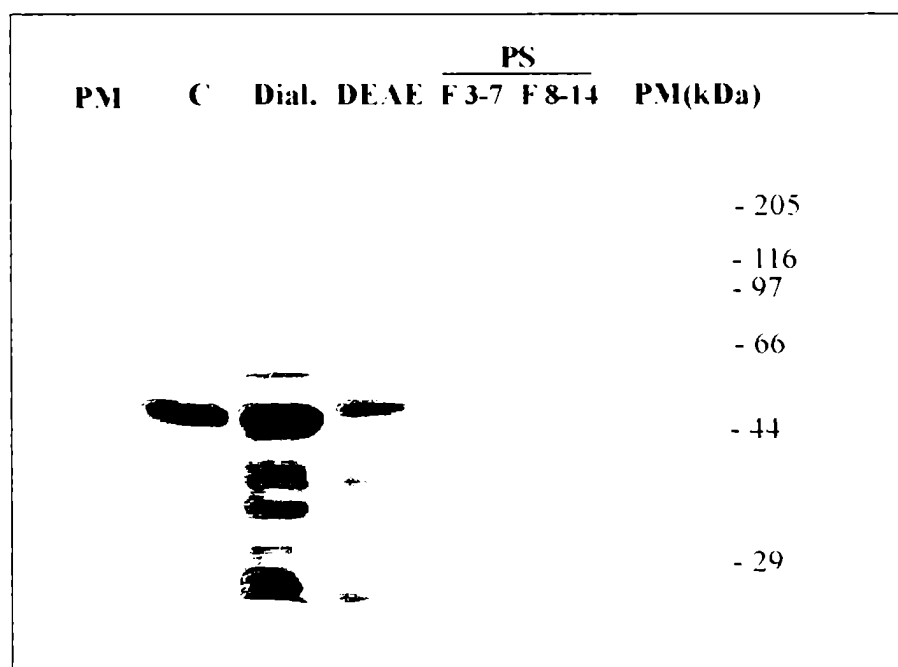
Las actividades de SST e INV se solaparon durante la purificación con DEAE-Sepharose y co-purificaron junto con el segundo pico de proteína. Sin embargo pudo reunirse un conjunto de fracciones (31 a 40) en donde la mayor parte de la actividad INV era descartada y se mantenía alta actividad SST. Esas fracciones se concentraron y sembraron en una columna de Phenyl-Sepharose.

Los patrones de proteínas separadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie mostraron pocas bandas al final del protocolo de purificación (Figura 30).

La purificación, según esta secuencia, se realizó partiendo de más cantidad de tejido, a fin de tener al final la cantidad suficiente de enzima para la medición de sus características bioquímicas. La separación de las dos actividades fue imposible de repetir a una mayor escala.

### **6.3 – Características bioquímicas de la actividad SST de *Bromus pictus***

En varios trabajos anteriores se han utilizado inhibidores de INV para lograr medir actividades SST sin interferencia de esta enzima (Cairns y Ashton, 1994;). Dentro de estos inhibidores, los que contienen piridoxal han sido los más utilizados, siendo el clorhidrato de piridoxal (HCl-Piridoxal) el de uso más común. Con el objetivo de obtener una baja actividad INV en las mezclas de reacción, se utilizaron distintas concentraciones de este inhibidor para medir distintos parámetros de la actividad SST utilizando enzima de vástagos de *B. pictus* expuestos a frío y purificadas por precipitación con sulfato de amonio y DEAE-Sepharose.



**Figura 30:** Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS de fracciones purificadas de SST de *Bromus pictus*. Se utilizaron extractos crudos (C) de vástagos de plantas expuestas siete días a bajas temperaturas para ensayar precipitaciones con sulfato de amonio seguida de diálisis (Dial), cromatografía en DEAE-Sephacel (DEAE) y cromatografía en Phenyl-Sepharose (Phenyl-Seph.). Alicuotas de cada paso de purificación se sembraron en geles al 8% de acrilamida y se tiñieron con azul de Coomasie.

Se utilizaron dos concentraciones de HCl-Piridoxal (20 y 50 mM) y se ensayaron las actividades SST e INV en las condiciones antes utilizadas. Se calcularon los porcentajes de actividad de las enzimas y la sacarosa remanente en el tubo luego de la incubación con el extracto proteico (Tabla 9). El HCl-Piridoxal inhibió fuertemente la actividad INV. La actividad SST fue también inhibida, pero mucho más levemente, por lo que la relación entre las dos actividades cambió considerablemente.

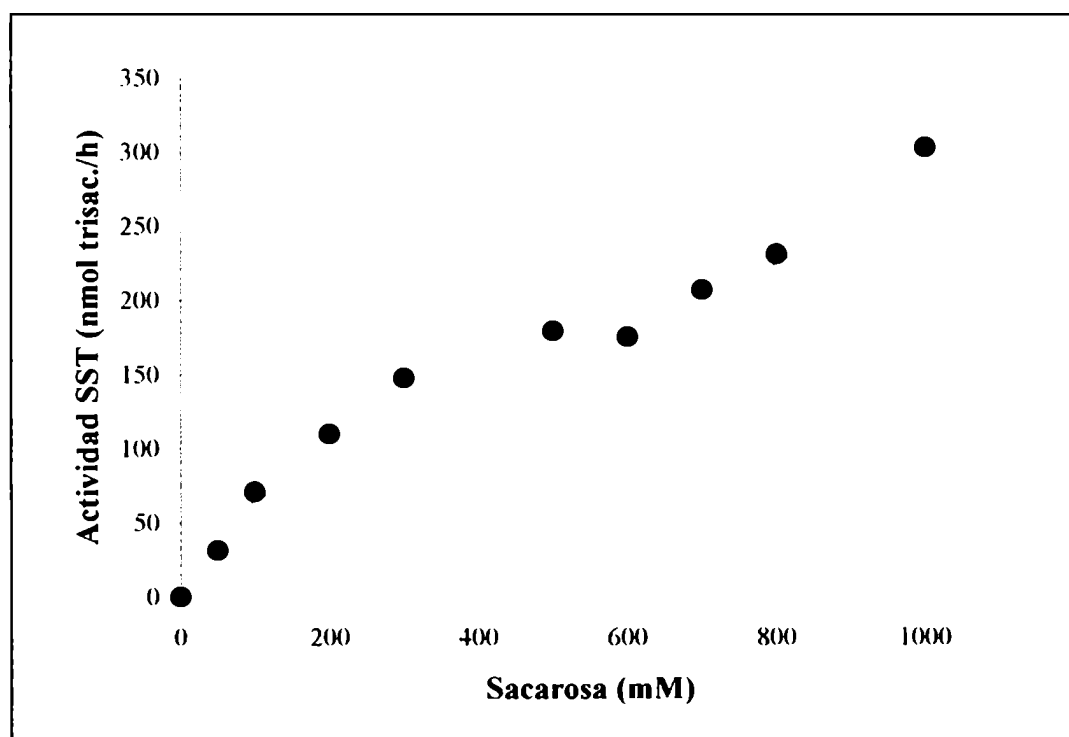
Tomando en cuenta estos resultados, se realizaron las mediciones posteriores utilizando 20 mM de HCl-Piridoxal, cuya presencia mantuvo la concentración de sacarosa en los tubos de reacción a niveles comparables a los iniciales.

**Tabla 9: Inhibición de la actividad INV y SST por HCl-Piridoxal.** Se utilizaron dos concentraciones de HCl-Piridoxal, 20 y 50 mM, en el tubo de reacción de las actividades. Se cuantificó la sacarosa remanente en todos los casos luego de incubar una hora a 30°C.

| <b>Tubo de reacción</b> | <b>Actividad INV</b> | <b>Actividad SST</b> | <b>Sacarosa remanente</b> |
|-------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|
| Control                 | 0 %                  | 0%                   | 10 $\mu$ moles            |
| Sin HCl-Piridoxal       | 100 %                | 100%                 | 8,6 $\mu$ moles           |
| HCl-Piridoxal 20 mM     | 16,5 %               | 67 %                 | 9,8 $\mu$ moles           |
| HCl-Piridoxal 50 mM     | 10,3 %               | 48 %                 | 9,8 $\mu$ moles           |

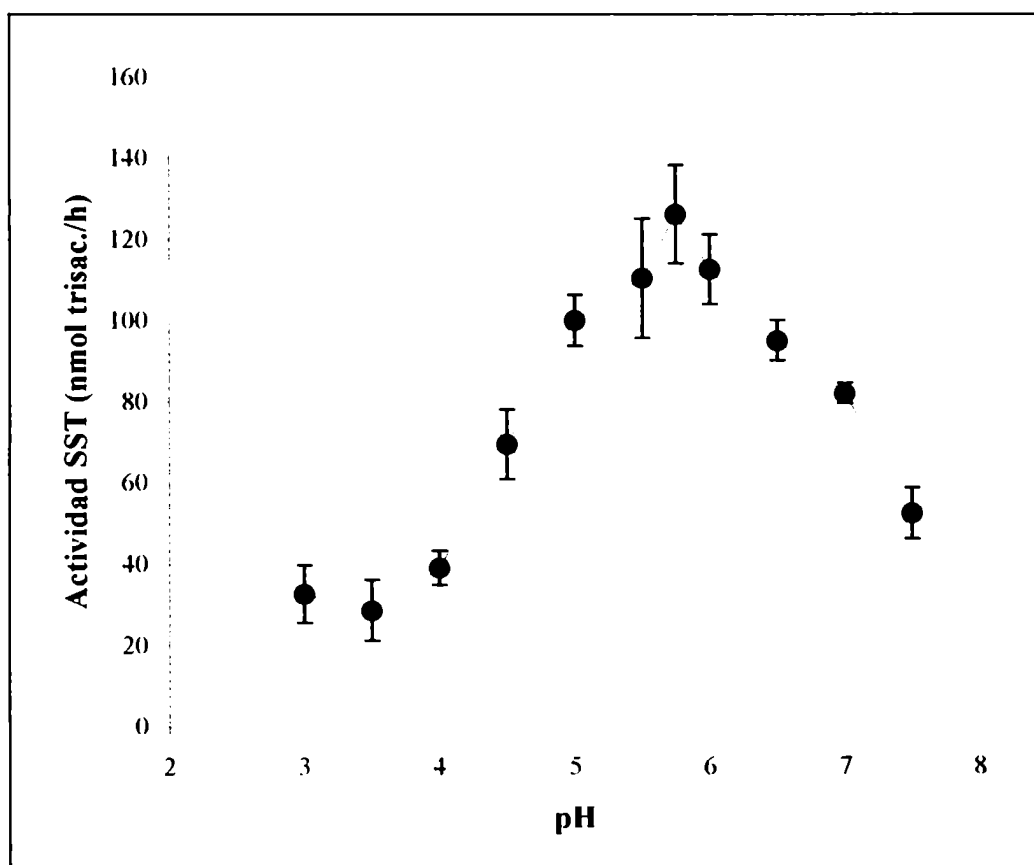
Para caracterizar algunos parámetros bioquímicos de la actividad SST de *B. pictus*, se midió la actividad parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio y DEAE-Sephacel a diferentes concentraciones de sustrato, utilizando HCl-Piridoxal 20 mM como inhibidor de INV (Figura 31)

Se ensayó la actividad SST a distintos pH utilizando los buffers de la serie de McIlvaine (McIlvaine, 1921) (Figura 32).



**Figura 31:** Actividad SST de *Bromus pictus* a distintas concentraciones de sacarosa. Se utilizaron fracciones proteicas purificadas para ensayar la actividad SST a distintas concentraciones de sustrato, usando HCl-piridoxal como inhibidor de INV.





**Figura 32:** Actividad SST de *Bromus pictus* en relación con el pH. Se utilizaron fracciones proteicas purificadas ensayar la actividad SST a distintos pH utilizando la serie de buffers de McIlvaine (1921) y HCl-Piridoxal como inhibidor de INV.

## **7 – Estudios moleculares de enzimas del metabolismo de fructanos**

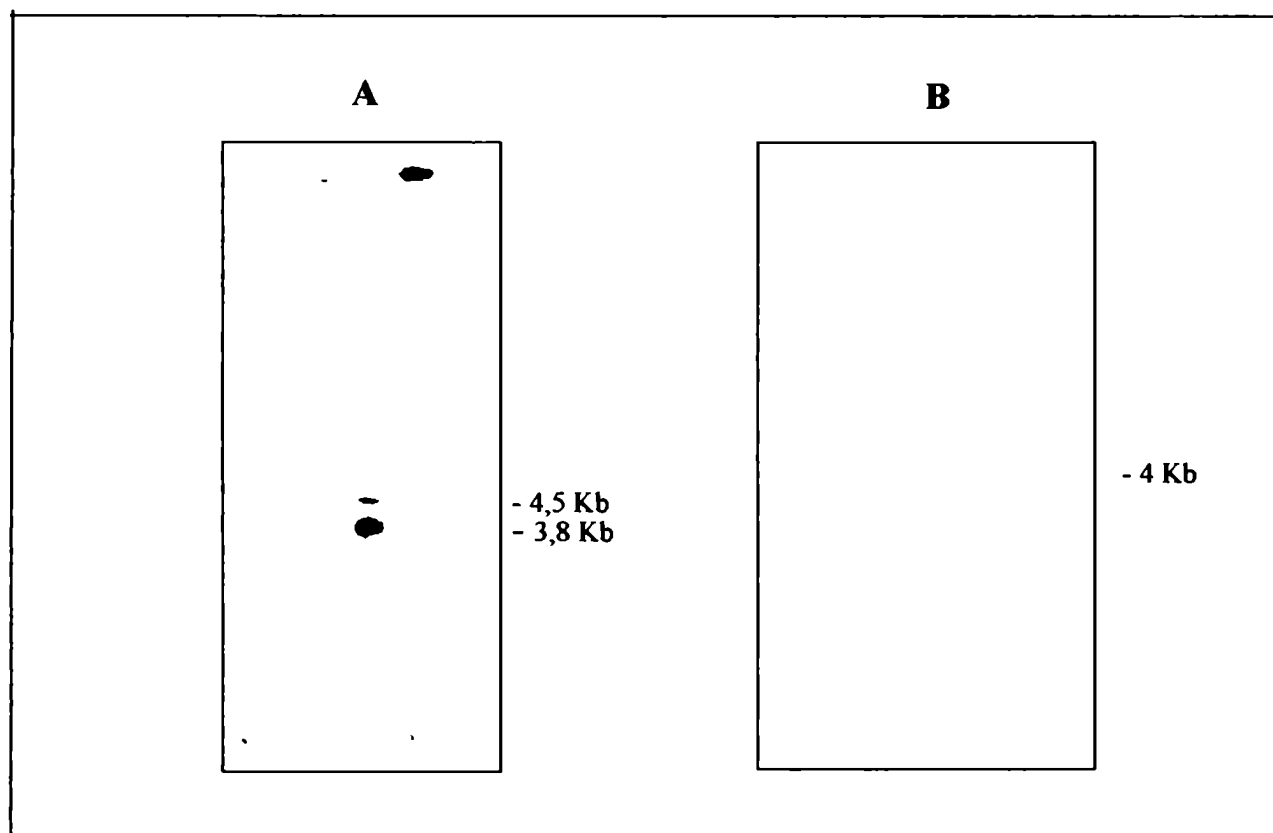
### **7.1 - Análisis moleculares con el ADNc de la 6-SFT de cebada**

#### **7.1.1 – Estudios de hibridación de ADN genómico**

Se estudiaron algunas características moleculares de los genes del metabolismo de fructanos en la especie patagónica, basados en los estudios bioquímicos y fisiológicos realizados en *B. pictus* en cuanto al metabolismo de fructanos en relación con la respuesta al tratamiento con bajas temperaturas. Estudios de hibridación con genes ya clonados de otras especies nos permitirían obtener información acerca de la existencia de secuencias homólogas en *B. pictus*. El objetivo último fue intentar el clonado de los genes de este metabolismo en la especie patagónica. El ADNc de la única enzima del metabolismo de fructanos clonada hasta el momento, la 6-SFT de cebada, era una buena herramienta para intentar el clonado de genes enzimas del metabolismo de fructanos en esta especie patagónica.

Se realizaron estudios de hibridación de ácidos nucleicos utilizando el ADNc de la 6-SFT de cebada como sonda. El ADN extraído de vástagos de *B. pictus* fue digerido con enzimas de restricción, separado en geles de agarosa y transferido a membranas de nylon. Estas membranas se utilizaron para realizar estudios tipo “southern”, hibridando con el cADN de la 6-SFT de cebada por marcación de nucleótidos al azar con  $^{32}\text{P}$ . Se utilizaron condiciones de baja astringencia para la hibridación con esta sonda heteróloga.

Las autorradiografías de los fragmentos digeridos con *HinD* III revelaron dos bandas intensas de aproximadamente 4,5 y 3,8 Kb. La digestión con *EcoR* I mostró una sola banda de alrededor de 4 Kb (Figura 33).



**Figura 33:** Hibridación de secuencias de ADN genómicas de *Bromus pictus* con el ADNc de la 6-SFT de cebada. El ADN fue digerido con las enzimas de restricción *HinD* III (A) y *EcoR* I (B), sometido a electroforesis en geles de agarosa y transferido a membranas de nylon. La sonda se marcó por oligonucleótidos al azar con [ $^{32}\text{P}$ ] y la membrana se hibridó en condiciones de baja astringencia.

### 7.1.2 – Estudios de expresión

Se realizaron estudios tipo “northern” con el objeto de analizar la existencia de secuencias de ARN homólogas al ADNc de la 6-SFT de cebada, expresados bajo las condiciones de frío en los vástagos de *B. pictus*. La misma sonda utilizada con el ADN genómico, se utilizó para ensayar estudios de expresión.

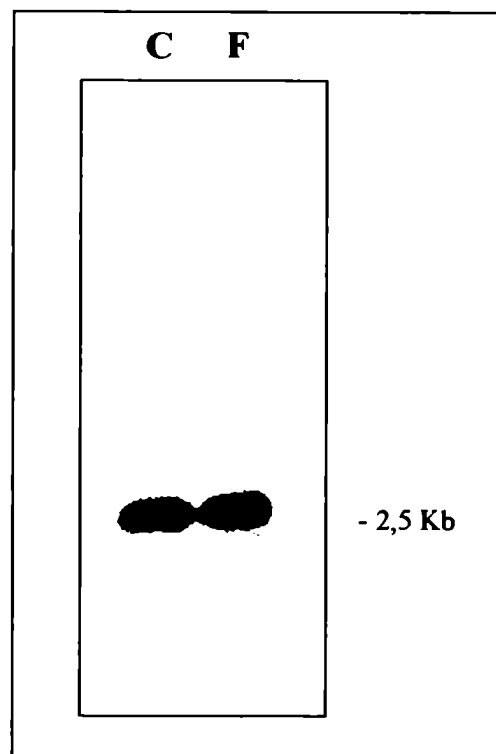
Se extrajo ARN total de vástagos de plantas de *B. pictus* crecidas en condiciones control y expuestas a dos días de bajas temperaturas. Con estos extractos se corrieron geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído y se transfirieron los ARN a membranas de nylon. Las membranas se hibridaron con la sonda de 6-SFT, utilizando idénticas condiciones de hibridación y lavado que en el caso de las hibridaciones con ADN genómico. La autorradiografía reveló una banda de hibridación en ambos extractos, de aproximadamente 2,5 Kb (Figura 34). No se observaron bandas de menor intensidad.

## 7.2 – Clonado por PCR de secuencias de fructosil transferasas

### 7.2.1 – Clonado por RT-PCR

Utilizando secuencias conocidas de genes de INV y enzimas de fructanos de Gramíneas, se diseñaron oligonucleótidos específicos en zonas altamente conservadas de la secuencia, tanto de aminoácidos como de nucleótidos (Figura 35 A).

Sólo uno de los oligonucleótidos ( $U_1$ ) se sintetizó degenerado en la base 15 (C ó T), los demás correspondieron a secuencias totalmente conservadas en la mayoría de las secuencias utilizadas para el diseño. Los oligos cubrieron una parte importante de la secuencia de las proteínas conocidas (Figura 35 B). Los tamaños esperados de las secuencias amplificadas coincidieron con los obtenidos en el caso del clon de la 6-SFT de cebada, utilizada como control. La combinación  $U_1L_2$  mostró un fragmento único de amplificación de aproximadamente 1,5 Kb, utilizando 55°C como temperatura de apareamiento.



**Figura 34:** Análisis de expresión en vástagos de plantas de *Bromus pictus* mantenidas en condiciones control y expuestas dos días de bajas temperaturas utilizando el ADNc de la 6-SFT de cebada como sonda. Se extrajo ARN en ambas condiciones, se ensayaron electroforesis desnaturizantes en geles de agarosa y se transfirió el ARN a membranas de nylon. La sonda se marcó por oligonucleótidos al azar con [  $^{32}\text{P}$ ] y la membrana se hibridó en condiciones de baja astringencia.

A

|                  |                     |            |               |        |         |
|------------------|---------------------|------------|---------------|--------|---------|
| <b>6-SFT Ceb</b> | GWYHMFYQYNP         | WGHAVS     | GSMTVLPIMLYTG | KDFRDP | TGEWEC  |
| <b>1-SST Chl</b> | GWYHMFYQYNP         | WGHSVS     | GSATVLPIMLYTG | KDFRDP | TGMWEC  |
| <b>1-SST Cln</b> | GWYHMFYQYNP         | WGHSVS     | GSATVLPIMLYTG | KDFRDP | TGMWEC  |
| <b>INV Maiz</b>  | GWYHMFYQYNP         | WGHAVS     | GSATVLPIMLYTG | TDFRDP | TGMWEC  |
| <b>INV Trigo</b> | NP                  | WGHAAS     | GSATVLPIMLYTG | KDFRDP | TGMWEC  |
|                  | Upper 1             |            |               |        |         |
| <b>6-SFT Ceb</b> | DLGIGLRYDWGKFYASTSF | RRVLMG     | KGWA          | EADV   | LVDHSIV |
| <b>1-SST Chl</b> | DVGIGLRYDYGKFYASKTF | RRVLWG     | KGWA          | EADV   | LVDHSIV |
| <b>1-SST Cyn</b> | DVGIGLRYDFGKFYASKTF | RRVLWG     | KGWA          | EADV   | LVDHSIV |
| <b>INV Maiz</b>  | DVGIGLRYDYGKFYASKTF | RRVLWG     | KGWA          | EADV   | LVDHSIV |
| <b>INV Trigo</b> | DVGIGLRYDWGKFYASKTF |            |               |        |         |
|                  | Upper 2             | Lower 1    |               |        |         |
| <b>6-SFT Ceb</b> | TSRVYP              | LFNNATGASV |               |        |         |
| <b>1-SST Chl</b> | TSRVYP              | LFNNATGISV |               |        |         |
| <b>1-SST Cyn</b> | TSRVYP              | LFNNATGISV |               |        |         |
| <b>INV Maiz</b>  | TSRVYP              | LFNNATHAHV |               |        |         |
|                  | Lower 2             |            |               |        |         |

B

MGSHGKPLPYAYKPLPSDAADGKRTGCMRWSACATVLTASAMAVVVVGATLLAGLRMEQAVDEEAAAGGFP  
 WSNEMLQWQSGYHFQTAKNYMSDPNGLMYRGWYHMFYQYNPVGTDWDDGMEWGHAVSRNLVQWRTLPIAM  
 VADQWYDILGVLGSGMTVLPNGTVIMIYTGATNASAVEVQCIATPADPNDPLRRWTKHPANPVIWSPPGVG  
 TKDFRDPMTAWYDESDETWRTLLGSKDDHDGHHDGIAMMYKTKDFLNYELIPGILHRVVRTGEWECIDFYFV  
 GRRSSDNSSEMLHVLKASMDDERHDYYSLGTYDSAANTWTPIDPELDLIGLRYDWGKFYASTSFYDPAKNR  
 RVLMGYVGEVDSKRADVVKGWASIQSVPRTVLDEKTRTNLLWPVEEIEIETLRLNATELTDVTINTGSIHI  
 PLRQGTQLDIEASFHLDAVAALNEADVGYNCSSSGAVNRGALGPFGLLVLAAGDRRGEQTAVYFYVSRG  
 LDGGLHTSFCQDELRSRAKDVTKRVI GSTVPLDGEALSMRVLVDHSIVQGFDMGGRTTMTSRVYPMESYQ  
 EARVYLFNNATGASVTAERLVVHEMDSAHNQLSNEDDGMYLHQVLESRH

**Figura 35: Diseño de oligonucleótidos específicos en regiones conservadas de secuencia de aminoácidos de enzimas del metabolismo de fructanos e INV de varias especies. A, Secuencias de aminoácidos altamente conservadas utilizadas para diseñar los oligonucleótidos Upper 1 y 2 y Lower 1 y 2. B, Secuencia de aminoácidos de la 6-SFT de cebada indicando las regiones amplificadas utilizando los oligonucleótidos específicos**

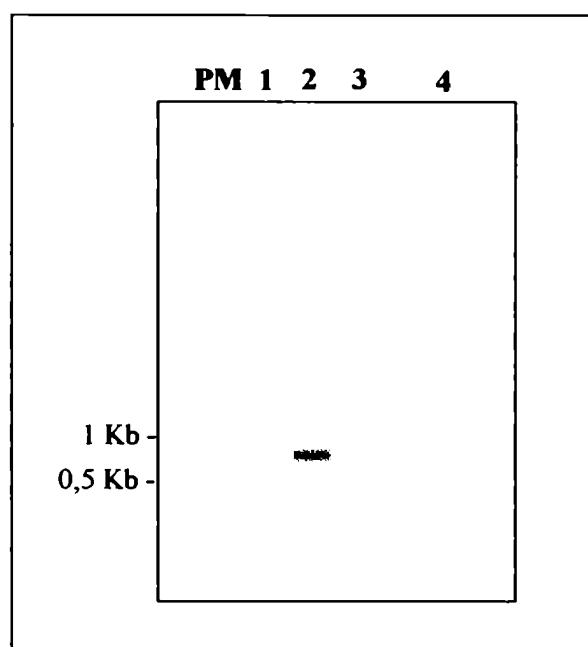
diseñados. El par U<sub>2</sub>L<sub>2</sub> amplificó también un sólo fragmento de alrededor de 760 pb usando 60°C para el apareamiento.

Se sintetizó ADNc utilizando ARN total de vástagos de *B. pictus* expuestos 7 días a bajas temperaturas, utilizando como oligonucleótidos oligo-dT, oligonucleótidos al azar y el oligonucleótido L<sub>2</sub>.

A partir de este templado, se amplificaron las secuencias de la especie patagónica, utilizando las distintas combinaciones de oligos posible: U<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, U<sub>1</sub>L<sub>2</sub> y U<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. De las tres combinaciones se logró la amplificación solamente con U<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. El fragmento amplificado coincidió con el tamaño esperado de aproximadamente 760 pb (Figura 36). La amplificación dió productos sólo en el caso de la síntesis de ADNc con el oligo específico y con oligonucleótidos al azar, no se observó amplificación en el caso de la síntesis de ADNc con oligo-dT.

El fragmento obtenido por RT-PCR se clonó en el vector pGEMT Easy (Promega) y se transformó en células competentes de *E.coli* DH5α. Los plásmidos de todas colonias analizadas (18 en total) mostraron por digestión con EcoR I un fragmento de 760 pb.

Los oligonucleótidos específicos diseñados pueden amplificar más de una secuencia, debido a la alta homología entre todos los genes de las enzimas de fructanos y de INV. Para analizar esta posibilidad se secuenciaron los clones G3, G9 y G11.



**Figura 36:** RT-PCR de ARN total de vástagos de plantas de *Bromus pictus* expuestas siete días a bajas temperaturas. La transcripción reversa se realizó utilizando a L<sub>2</sub> (calle 1), hexanucleótidos al azar (calle 2), oligo-dT (calle 3) como oligonucleótidos. El control negativo sin ADNc se muestra en la calle 4. La amplificación se realizó con U<sub>2</sub>L<sub>2</sub>.



### 7.2.2 – Secuencias genómicas de las especies de *Bromus*

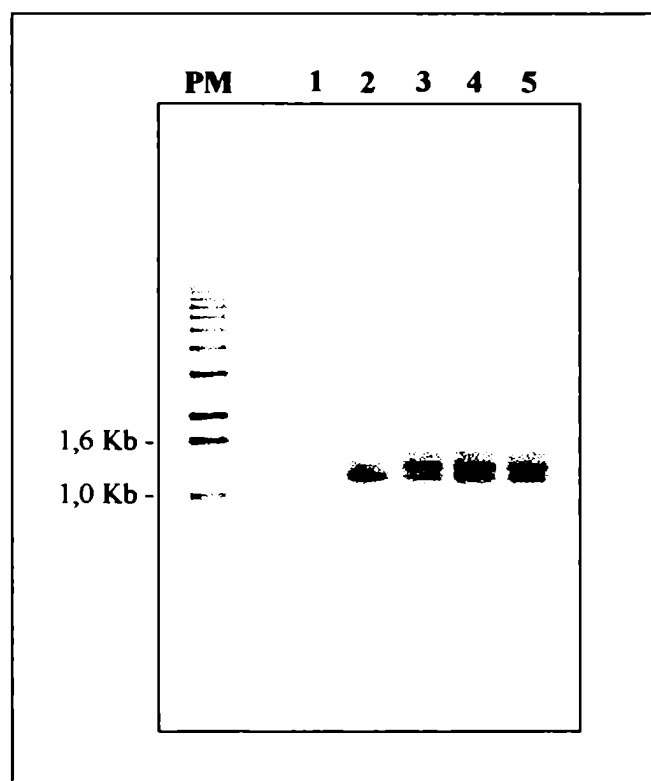
Usando ADN de ambas especies de *Bromus* como templado, se intentó la amplificación de secuencias genómicas con los pares de oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR. Los fragmentos amplificados con la combinación U<sub>2</sub>L<sub>2</sub> se separaron en un gel de agarosa 1,2% (Figura 37).

En ambas especies se logró la amplificación de secuencias correspondientes a pesos moleculares entre 1,2 y 1,4 Kb. En *B. auleticus* se distinguieron dos fragmentos, mientras que en *B. pictus* se observó una tercera banda amplificada de mayor peso molecular, además de las dos encontradas en la especie del norte.

### 7.3 – Biblioteca de ADN copia de *Bromus pictus* en fagos

La construcción de una biblioteca de ADNc en fagos se llevó a cabo según el protocolo del kit de  $\lambda$ -ZAP II (Stratagene), a partir de ARN total de vástagos de *B. pictus* sometidos 7 días a bajas temperaturas, período en el cual esta especie mostró la mayor actividad SST.

El ADNc sintetizado se clonó en el vector  $\lambda$ -ZAPII, se empaquetó en fagos y se amplificó la biblioteca primaria.



**Figura 37:** Fragmentos genómicos de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* amplificados por PCR usando la combinación de oligonucleótidos U<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. Se amplificaron por PCR secuencias genómicas usando ADN de *B. auleticus* (calles 1 y 2) y de *B. pictus* (calles 3, 4 y 5) como templado.

#### 7.4 – Secuenciación de clones positivos

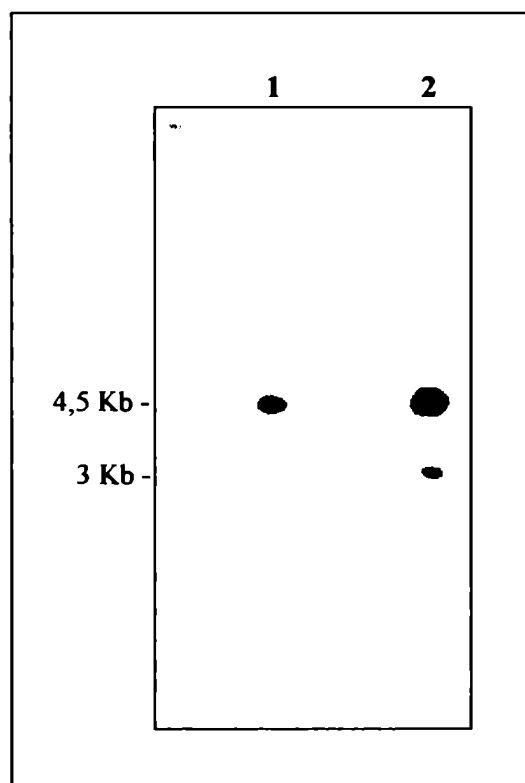
Se secuenciaron los clones G3, G9 y G11 provenientes del fragmento de RT-PCR de 760 pb clonado en pGEMT Easy (pBP760). El clon G11 se secuenció en ambas direcciones utilizando los oligonucleótidos universales T7 y SP6, obteniéndose la secuencia completa de nucleótidos del fragmento amplificado (Figura 38). Los clones G3 y G9 tuvieron la misma secuencia de nucleótidos que G11, por lo que corresponderían al mismo fragmento amplificado.

#### 7.5 – Análisis de secuencias

El fragmento BP760-G11 se utilizó para hibridar ADN genómico de *B. pictus* digerido con *HinD* III por medio de la técnica de “southern”. Se marcó la sonda con [<sup>32</sup>P] por el método de marcado con oligonucleótidos al azar y se hibridaron membranas a alta astringencia (65°C y SSC 0,1X / SDS 0,1%). Las autorradiografías revelaron dos bandas de hibridación, una muy intensa de aproximadamente 4,5 Kb y otra mucho más tenue de aprox. 3 Kb (Figura 39). La banda mayoritaria coincide en PM con una de las dos bandas encontradas en el ADN genómico digerido con la misma enzima e hibridado con la sonda de la 6-SFT de cebada (Figura 31).

5'...TGGGGATCGGGTTGAGATACGATTGGGGTAAGTTTTATGCGTCCACCTCGTTCTATGATC  
 CGGCGAAGCAGCGGCGCGTGCTGATGGGGTACGTTGGCGAGGTCGACTCCAAGCGGGCCGA  
 CGTCGTGAAGGGGTGGGCCTCAATTCAGTCAGTTCCAAGGACGGTGGCTCTAGACGAGAAG  
 ACCCGGACCAACCTCCTCCTGTGGCCTGTGGAGGAGATTGAGAACCTCCGACTTAATGCCAC  
 CGAACTTAGCGACATCACCATTAACGCCGGCTCCGTCCTCCATGTCCCCGTCCGCCAAGCCA  
 CTCAGCTCGACATCGAGGCCACTTTCCACCTTGATGCTTCTGCCGTTACTGCCCTCAATGAGG  
 CCGACGTGAGCTACAACCTGTAGTAGCAGCGGCGGTGCTGCTACCCGCGGCGCGCTAGGCCC  
 CTTCGGCCTCCTCGTCCTCACTGCCGGCGATCGTCGTGGCGAGCAGACGGCGGTGTAATTCT  
 ACGTGTCCAGGGGCCTCGACGGAGGCCTCCGGACCAGCTTCTGCCAAGACGAGTCGCGGTC  
 GTCACGGGCCAGAGACGTGACGAAGCGGGTGATTGGGAGCACGGTGCCAGTGCTCGAAGGT  
 GAGGCCTTTTCGATGAGGGTGCTCGTGGACCACTCCATCGTGCAGGGCTTCGCCATGGGCGG  
 GAGGACCACGATGACTTCACGGGTGTACCCCATGGAGGCCATCTATGAGAAGGCGGGACTG  
 TACTTGTTCAACAACGCCACCGG...3'

**Figura 38:** Secuencia de pBP760-G11 de *Bromus pictus* aislado por RT-PCR a partir de ARN de vástagos de plantas expuestas siete días a 4°C. El ADNc se sintetizó con hexanucleótidos al azar y el fragmento de 760 pb se amplificó utilizando la combinación de oligonucleótidos específicos U<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. Los fragmentos se clonaron en pGEMT Easy y el clon G11 se secuenció en ambas direcciones utilizando oligonucleótidos universales. Oligonucleótidos específicos utilizados: U<sub>2</sub> — y L<sub>2</sub> —



**Figura 39:** Hibridación de secuencias de ADN genómicas de *Bromus pictus* con BP760-G11. El ADN fue digerido con la enzima de restricción *HinD* III, sometido a electroforesis en gel de agarosa y transferido a membrana de nylon. La sonda se marcó por oligonucleótidos al azar con [ $^{32}\text{P}$ ] y la membrana se hibridó en condiciones de alta astringencia. 1, 10  $\mu\text{g}$  ADN; 2, 20  $\mu\text{g}$  de ADN.

Se comparó la secuencia deducida de aminoácidos de BP760-G11, fragmento proveniente de la amplificación por RT-PCR de secuencias de *B. pictus*, con secuencias obtenidas del banco de secuencias GeneBank de enzimas del metabolismo de fructanos e INV conocidas (6-SFT de cebada, 1-SST y 1-FFT de *H. tuberosus*, 1-SST y 1-FFT de *C. scolyumus*, 1-SST de *C. intybus* e INV ácidas de maíz y espárrago) . Se utilizó el programa MegAlign (DNASStar) y el método de alineamiento en bloques para realizar una comparación de la secuencia completa de aminoácidos deducidos. BP760-G11 mostró una alta homología con la 6-SFT de cebada, con la 1-SST y 1-FFT de especies mono y dicotiledóneas y con INV ácidas solubles de varias especies vegetales (Figura 40 A).

Los índices de similitud entre las secuencias conocidas de enzimas de fructanos e INV de monocotiledóneas se muestran en un árbol (Figura 40 B). BP760-G11 está asociada a la 6-SFT de cebada, las únicas dos secuencias de Gramíneas se encuentran separadas del resto de las enzimas de fructanos e INV. Las 1-SST y 1-FFT de Compuestas se agrupan en bloques separados entre sí y tienen mayor similitud con las INV y las 6G-FFT y 1-SST de *A. cepa* que con las enzimas de Gramíneas.

A

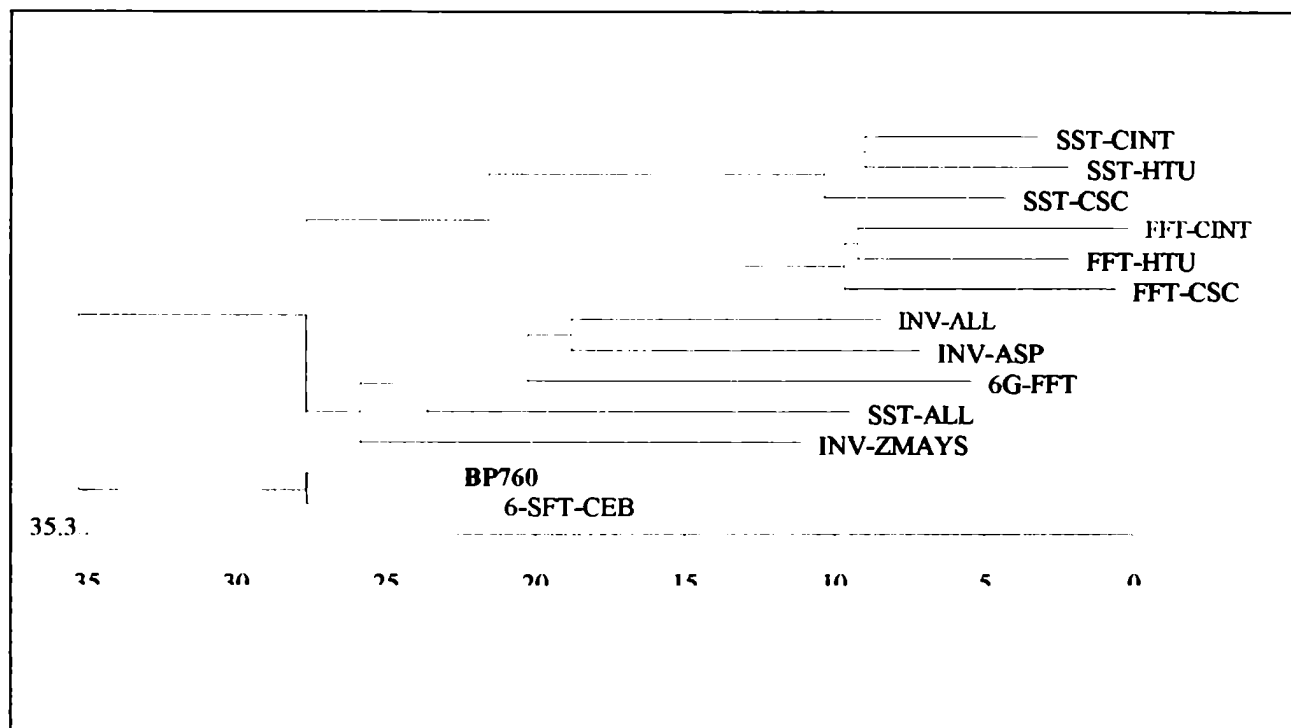
DWGKFYASTSFYDPAKQRRVLMGYVGEVDSKRADVKGWASIQSVPTVALDEKTRTNLLL BP760 . PRO  
 DWGKFYASTSFYDPAKNRRVLMGYVGEVDSKRADVKGWASIQSVPTVALDEKTRTNLLL 6-SFTCEB . PRO  
 DYGKFYASKTFYDQEKRRVLMGYVGEVDSKADDILKGWASVQNTARTILFADAKTRSNLLV SSTALL . PRO  
 DYGKFYASKTFYDQHKRRVLMGYVGETDPPKSDLLKGWANI LNI PRSVVLDTQTGTNLIQ SSTCINT . PRO  
 DFGKFYASKTFYDQHKRRVLMGYVGETDPPKYDVYKGWANI LNI PRTIVLDTKTNTNLIQ SSTCSC . PRO  
 DFGKFYASKTFYDQHKRRVLMGYVGETDPOKYDLSKGWANI LNI PRTVVLDTETKTNTNLIQ SSTHTU . PRO  
 DYGRFASKSLYDPLKRRVLMGYVAESDSADQDLNRGWATI YNVARTIVLDRKTGTTHLLH FFTCINT . PRO  
 DYGRFASKSLYDPLKRRVLMGYVAESDSYDQDVSRGWATI YNVARTIVLDRKTGTTHLLH FFTCSC . PRO  
 DYGRFASKSLYDPLKRRITWGYVGESDSADQDLNRGWATI YNVARTIVLDRKTGTTHLLH FFTHTU . PRO  
 DWGKFYASRTTFDPLKORRIWGYIGEVDSSQADIAKGWASLQGI PRSVLYDVKTGTNVLIT 6G-FFT . PRO  
 DWGKFYASKTFYDHAQRRVLMGYIGESDSADILKGWASLQGVPTVLLDVKTGNSNLT INVAL . PRO  
 DLGKFYASKTFYDQEKRRVLMGYIGESDSADILKGWASLQGI PRTVLYDLRTGNSNLT INVASP . PRO  
 DYGKYFASKTFYDFVLRVLMGYVGETDSEADILKGWASVQSI PRTVLLDTKTGNSNLLQ INVZMAYS . PRO

WPVEEIEENLRNA-TELSDITINAGSVLHVP-VROATQLDIEATFHL--DASAVTALNEAD BP760 . PRO  
 WPVEEIEENLRNA-TELTDVTINTGSVIHP-LRQGTQLDIEASFHL--DASAVAALNEAD 6-SFTCEB . PRO  
 WPVEELDALTSG-KEFNGVVEPGSTYHL-DVGTATQLDIEAEFEINKEAV--DAVVEAD SSTALL . PRO  
 WPIEEVEKLRTSTYKDEFKDVELRPGSLVPL-EIGATQLDISATFEIDQKIL--QSTLEAD SSTCINT . PRO  
 WPIAEVENLRNKNYNEFKDVELKPGSLIPL-EIGATQLDITATFEVDQIML--ESTLEAD SSTCSC . PRO  
 WPIEETENLRSKKYDEFKDVELRPGALVPL-EIGATQLDIVATFEIDQKML--ESTLEAD SSTHTU . PRO  
 WPAEEIESLRYDG-REFKBIELAPGSLMPL-DIGATQLDIVATFEVEQETP--MRTSDTN FFTCINT . PRO  
 WPVEEIESLRNG-HEFKNITLPGSLIPL-DVGTATQLDIVATFEVDQKAL--KATSDTN FFTCSC . PRO  
 WPVEEIESLRNG-REFKBIELAPGSLIPL-DIGATQLDIVATFEVDQKAL--NATSETD FFTHTU . PRO  
 WPIEEMGLRMR-KDFSGIKIKGSTVELSDFGDAFQIDIEAEFTISKEAL--EATIEAD 6G-FFT . PRO  
 WPVVEIESLRTRP-RDFSGITVDAGSTFKL-DVGGAAQLDIEAEFKISSEEL--EAVVEAD INVAL . PRO  
 WPIEVEESLRNL-HDFSGITIDKGSTFHL-DVHGAAQLDIEAEFKINEESLSAEENGTEG INVASP . PRO  
 WPVVEEVENLRMSG-KSFDGVALDRGSVVPL-DVGKATQLDIEAVFEV--DASDAAGVTEAD INVZMAYS . PRO

VSYNCSSSGGAATRGALGPFGLLVLTAGDRRGEQTAVFYVSRGLDGGRLTSFCQDESRS BP760 . PRO  
 VGYNCSSSGGAATRGALGPFGLLVLAAGDRRGEQTAVFYVSRGLDGGRLTSFCQDELRS 6-SFTCEB . PRO  
 VTYNCSSTSDGAHRGLGPFGLLVLA-NEKMTTEKTATYFYVSRVNDGGLQTHFCQDELRS SSTALL . PRO  
 VLFNCITSEGSVGRVGLGPFGLVLA-DANRSEQLPVYFYIAKDTGTSKTYFCADESRSS SSTCINT . PRO  
 VLFNCITSEGSAGRVGLGPFGLVLA-DAERSEQLPVYFYIAKDTGSSKTYFCADESRSS SSTCSC . PRO  
 VLFNCITSEGSVARVGLGPFGLVLA-DAQRSEQLPVYFYIAKDTGTSRITYFCADETRSS SSTHTU . PRO  
 GEYGCITTSAGATERGSLGPFGLVLA-DGTLSELTPVYFYIAKDTGDSVATHFCTDKLRSS FFTCINT . PRO  
 DEYGCITTSAGAAKEVLDHSGGLVLA-HGTLSELTPVYFYIAKDTGDSVATHFCTDKLRSS FFTCSC . PRO  
 DIYGCITTSAGAAQRLGSLGPFGLVLA-DGTLSELTPVYFYIAKADGGVSTHFCTDKLRSS FFTHTU . PRO  
 VGYNCSSSGGAATRGALGPFGLLVLA-NQDLTEQTATYFYVSRGMDGGLNTHFCQDETRSS 6G-FFT . PRO  
 VSYNCSSSGGAATRGALGPFGLLVLA-NQDLTEQTATYFYVSRGMDGGLNTHFCQDETRSS INVAL . PRO  
 VMYNCSGGGAAERGLGPFGLLVLA-NSDLTEQTATYFYVSRGMDGGLNTHFCQDEMRSS INVASP . PRO  
 VTFNCSTSGAAGRGLGPFGLLVLA-DDDLSEQTAVFYFYLLKGTGDSLQTHFCQDELRS INVZMAYS . PRO

RARDVTKRVIGSTVPVLEGEAFSMRVLVDHSIVQGFAMGGRTTMTSRVYPMEAIYKAGLY BP760 . PRO  
 RAKDVTKRVIGSTVPVLDGEALSMRVLVDHSIVQGFDMGGRTTMTSRVYPMES-YQEARVY 6-SFTCEB . PRO  
 KANDITKRVVGTVPVLDGETFSLRILVDHSIVESFAQKGRVATSRVYPTEAIYDSTRVF SSTALL . PRO  
 TDKDVGNVYVGSVPVLEGEAFSMRVLVDHSIVEGFAQGGRTVVTSRVYPTEAIYGAAKLF SSTCINT . PRO  
 NDVDIGKVVYVGSVPVLEGEAFSMRVLVDHSIVEGFAQGGRTVVTSRVYPTEAIYGAAKLF SSTCSC . PRO  
 KDVSVGNVYVGSVPVLDGEAFSMRVLVDHSIVEGFAQGGRTVVTSRVYPTEAIYGAAKLF SSTHTU . PRO  
 LDYDGERVVYVGSVPVLDGEAFSMRVLVDHSIVEGFAQGGRTVVTSRVYPTEAIYGAAKLF FFTCINT . PRO  
 YDYDGERVVYVGSVPVLDGEAFSMRVLVDHSIVEGFAQGGRTVVTSRVYPTEAIYGAAKLF FFTCSC . PRO  
 LDYDGERVVYVGSVPVLDGEAFSMRVLVDHSIVEGFAQGGRTVVTSRVYPTEAIYGAAKLF FFTHTU . PRO  
 KANDIVKRVVGTVPVLDGETFVAVRILVDHSIVESFAQKGRVATSRVYPTEAINSAARVF 6G-FFT . PRO  
 KASDIVKRVVGTVPVLDGESFALRILVDHSIVESFAQKGRVATSRVYPTEAIYNNARVF INVAL . PRO  
 KANDIVKRVVGTVPVLDGETFSLRILVDHSIVESFAQKGRVATSRVYPTEAIYSSAKVF INVASP . PRO  
 KANDIVKRVVGSVPVLDGENLSVRILVDHSIVESFAQKGRVATSRVYPTEAIYDSTRVF INVZMAYS . PRO

B



**Figura 41:** Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de BP760-G11 con enzimas conocidas del metabolismo de fructanos e INV ácidas. La comparación se realizó con el programa MegAlign (DNASar) , utilizando el método de alineamiento en bloques.

A, secuencia completa de aminoácidos deducidos de BP760-G11 comparadas con las secuencias antes mencionadas. Los aminoácidos sombreados corresponden a los que difieren de BP760-G11.

B, Arbol correspondiente a los índices de similitud de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias antes mencionadas.

6-SFTCEB, 6-SFT de cebada (Sprenger y col., 1995) ; SSTALL, 1-SST de *A. cepa* (Vijn y col., 1998); SSTCSC, 1-SST *C. scolyms* (Hellwege y col., 1997); SSCINT, 1-SST *C. intybus* Halleux y van Cutsem, 1997); SSTHTU., 1-SST de *H. tuberosus* (van der Meer y col., 1998); FFTCSC, 1-FFT de *C. scolyms* (Hellwege y col., 1998); FFTCINT, 1-FFT de *C. intybus* (Goblet y col., 1997); FFTHTU, 1-FFT de *H. tuberosus* (van der Meer y col., 1998); 6G-FFT, 6G-FFT de *A. cepa* (Vijn y col., 1997); );INVALL, INV ácida de *A. cepa* (Vijn y col., 1998); INVASP, INV ácida de espárrago (Dwyer y col., 1997); INVZMAYS, INV ácida *Z. mays* (Xu y col., 1995).



# **DISCUSSION**

## 1 - Selección del modelo de estudio

La elección de las especies utilizadas para los estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de fructanos se realizó luego de una búsqueda exhaustiva de los posibles géneros de Gramíneas distribuidos en la región patagónica. Entre estos géneros: *Bromus*, *Festuca* y *Agropyron* son los mejor representados (Somlo y col., 1985; Nicora y Rúgolo de Agrasar, 1987; Oliva y col., 1993; 1994).

Como resultado de este trabajo se logró la adaptación de las especies nativas *Agropyron magellanicum*, *Festuca gracillima*, *Festuca pallescens* y *B. pictus* a las condiciones de cultivo en laboratorio.

Los ensayos preliminares, en cuanto al metabolismo de azúcares, presentaron diferencias apreciables entre las especies. Tanto *F. gracillima* como *F. pallescens* mostraron aumentos en el contenido de sacarosa durante los cuatro días de frío ensayados y en el análisis del patrón de fructanos sólo se observaron trazas de trisacárido. En *A. magellanicum* se observó la presencia de fructanos de mayor GP durante la exposición a bajas temperaturas acompañado por un importante aumento de sacarosa. En las plantas de *B. pictus* se observaron también niveles altos de polímeros de fructosa, obteniéndose patrones complejos de fructanos con una mayor diversidad de oligosacáridos, en comparación con el resto de las especies analizadas. Esta especie contiene fructanos de alto GP tanto en condiciones control como en tejidos de plantas expuestas a 4°C. De las especies inicialmente estudiadas para analizar la respuesta a frío, se eligió *B. pictus* para realizar los estudios posteriores.

Por otra parte, la búsqueda de especies representadas en regiones del norte de la Argentina resultó en la elección de *B. auleticus* como especie adaptada a condiciones más benignas, logrando así la obtención de las dos especies requeridas para realizar los estudios comparativos.

## **2 – Estudios de la tolerancia a estrés por bajas temperaturas en *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* a través del metabolismo de sacarosa y fructanos**

### **2.1 – Análisis de los fructo-oligosacáridos de las especies de *Bromus***

Las plantas de ambas especies de *Bromus* mostraron una respuesta diferente frente a la exposición a 4°C. En la especie del norte, los fructósidos aumentaron significativamente durante el tratamiento de frío, sintetizándose oligosacáridos de mayor GP y aumentando varias veces el contenido total de fructanos (Figuras 8, 9 y 10). Esta respuesta ha sido encontrada en muchas de las especies de Gramíneas de climas templados que sintetizan fructanos (Robson y Jewiss, 1968; Chatterton y col., 1987; Chatterton y col., 1989; Suzuki, 1989; Tognetti y col., 1990; Chatterton y col., 1990; Solhaug, 1991; Prud'home y col., 1993; Santoiani y col., 1993; Bancal y Triboï, 1993; Equiza y col., 1997). *B. pictus*, la especie patagónica, mostró una respuesta diferente a todas las especies citadas. El contenido de fructo-oligosacáridos fue alto en las plantas mantenidas en condiciones control de crecimiento, mostrando niveles comparables a los observados en *B. auleticus* luego de siete días de tratamiento con bajas temperaturas. En vástagos de plantas control se observaron oligosacáridos de hasta GP 16 (Figuras 8, 11 y 12). Durante todo el período de frío ensayado las plantas patagónicas no mostraron una modificación importante en el contenido total de fructanos, aunque el patrón de fructo-oligosacáridos se vio modificado, observándose aumentos en los azúcares de bajo GP a expensas de los mayores.

La tolerancia a bajas temperaturas en plantas de climas templados es un requisito para sobrevivir a las condiciones del invierno y recobrar el crecimiento y el desarrollo en la primavera (Olien, 1967). La aclimatación al frío incluye la síntesis de componentes como proteínas, enzimas, lípidos y metabolitos. Muchos

estudios indican que la fotosíntesis es uno de los procesos más afectados por el frío, ya que a bajas temperaturas la tasa fotosintética sufre una importante disminución (Mitchell y Madore, 1992). A pesar de ello, se ha observado la acumulación de hidratos de carbono solubles bajo estas condiciones, indicando que la utilización de fotosintatos está aún más restringida que la fotosíntesis (Pollock, 1986; Griffith y McIntyre, 1993). En este sentido Robson y col. (1968) han encontrado en hojas de variedades de *Festuca arundinaceae* adaptadas a distintos ambientes, que las variedades más resistentes al frío acumulan más hidratos de carbono solubles que las variedades adaptadas a ambientes más benignos, siendo la sacarosa y los fructanos los principales azúcares solubles hallados en Gramíneas. Tognetti y col. (1990) describieron en hojas de variedades argentinas de trigo adaptadas a diferentes regiones, que los fructanos se encuentran en concentraciones equivalentes en variedades sensibles y resistentes a bajas temperaturas crecidas a 23°C, pero la velocidad de acumulación de estos azúcares durante el estrés por frío es mayor en los cultivares resistentes.

Las bajas temperaturas reducen drásticamente la tasa de crecimiento de las plantas (Robson y col. 1968; Griffith y McIntyre, 1993; Equiza y col., 1997). Sin embargo Equiza y col. (1997) han encontrado poca correlación entre crecimiento y acumulación de azúcares en vástagos de distintos cultivares de trigo primaverales e invernales. Los cultivares invernales acumularon en frío más azúcares reductores y fructanos que los primaverales, con pocas diferencias entre las tasas de crecimiento de sus partes aéreas.

La acumulación de azúcares puede tener una función dual de reserva de carbono y producción de crioprotectores (Bachman y col., 1994). La síntesis de almidón es relativamente sensible a las bajas temperaturas (Pollock y col, 1983; Stitt, 1987), por lo que la acumulación de formas alternativas de hidratos de carbono solubles de reserva podría ser una ventaja significativa en especies de climas templados que sufren durante su ciclo de vida períodos de bajas temperaturas. Muchas especies vegetales de climas templados acumulan sacarosa, fructanos o rafinosa cuando son

expuestas a períodos de frío. Estos hidratos de carbono solubles han sido fuertemente asociados a la aclimatación al frío en muchas plantas (Robson y col, 1968; Tognetti, 1990; Salerno y Pontis, 1989; Suzuki, 1989; Hinesley y col., 1992; Santoiani y col, 1993; Wiemken e Ineichen, 1993; Equiza y col., 1997). En varios trabajos se ha probado que la rafinosa, la trehalosa y la sacarosa protegen biomembranas y proteínas, actuando como solutos compatibles en condiciones de estrés por frío y déficit hídrico (Lineberger y Steponkus, 1980; Yancey y col., 1982; Crowe y col., 1984, 1988, 1992; Koster y Leopold, 1988; Sun y col., 1994). Aunque con los miembros de las series de fructanos no se han realizado estudios semejantes, las características moleculares de estos azúcares sugieren una función similar para estos fructo-oligosacáridos.

En la región Patagónica imperan condiciones severas de bajas temperaturas y déficit hídrico en la mayor parte del año (Boelcke, 1957, Soriano y Sala, 1986; Bustos y Rocchi, 1993; Tognetti y Salerno, 1995). Los altos niveles de fructo-oligosacáridos encontrados en los tejidos de *B. pictus*, en comparación con los niveles encontrados en *B. auleticus*, sugieren que estos azúcares están involucrados en la tolerancia a condiciones de estrés de la especie patagónica. Estos hidratos de carbono podrían tener función protectora de membranas y macromoléculas durante la exposición a bajas temperaturas y sequía. En este sentido, la depolimerización observada en *B. pictus* elevaría las concentraciones de sacarosa y oligosacáridos de bajo GP, moléculas propuestas como solutos compatibles.

Los patrones de fructósidos hallados en plantas de las dos especies de *Bromus* estudiadas mostraron una amplia variedad de oligosacáridos (Figuras 8 y 16). La serie derivada de la bifurcosa (1&6 kestotetraosa) es la más representada, encontrándose oligosacáridos con uniones  $\beta$ -2,6 de hasta GP 16. También se observó la presencia de una serie minoritaria que correspondería a los fructanos de la serie de las inulinas. Los tres isómeros de trisacárido 1-kestosa, 6-kestosa y neo-kestosa, además de rafinosa, trisacárido de glc-fru-gal, se encontraron en los tejidos de ambas especies. Chatterton y col. (1990, 1993) también observaron en otras dos

especies de *Bromus* (*Bromus inermis* y *Bromus tectorum*) patrones complejos de fructo-oligosacáridos. Estas dos especies mostraron contener 1-kestosa y 6-kestosa y cantidades comparables de rafinosa.

La caracterización de la estructura molecular de los fructanos resulta importante para abordar el estudio de las enzimas de la síntesis de estos polímeros en cada especie en particular. Como ya se ha detallado anteriormente (Figura 4), la vía de síntesis de estos polímeros de fructosa en gramíneas resulta ser más compleja que la encontrada en compuestas, por lo que la caracterización de los tipos de fructanos presentes permite hipotetizar acerca de las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de estos hidratos de carbono.

Las actividades enzimáticas responsables de la síntesis del patrón complejo de fructanos encontrado en las especies de *Bromus* no ha sido aún elucidada. Sin embargo, considerando las estructuras moleculares de los oligosacáridos de estas especies, es probable que la vía de síntesis y degradación de estos polímeros de fructosa incluya las actividades 1-SST, 6-SFT, 1-FFT, 6G-FFT, 1-FEH y 6-FEH (ver Figura 4).

## **2.2 – Análisis de las enzimas del metabolismo de sacarosa**

El metabolismo de fructanos se encuentra íntimamente asociado al metabolismo de sacarosa. La actividad SST de todas las especies de Gramíneas estudiadas requiere de una concentración alta de sacarosa, ya que las  $K_m$  aparentes de estas enzimas en Gramíneas serían superiores a 200 mM.

Durante el tratamiento con bajas temperaturas *B. pictus* y *B. auleticus* mostraron incrementos importantes en el contenido de sacarosa en vástagos (Figura 8). En la especie patagónica, los niveles de sacarosa de los vástagos de plantas expuestas siete días a 4°C se duplicaron con respecto a los controles (Figura 13).

Este aumento en el contenido de sacarosa de los vástagos de plantas expuestas a estrés por frío no pudo correlacionarse con variaciones en las actividades de las enzimas del metabolismo de este hidrato de carbono, en ninguna de las dos especies de *Bromus*, bajo las condiciones estudiadas.

Se demostró en el caso de la SPS que las modificaciones en la actividad se ponían en evidencia cuando era ensayada en condiciones especiales de sustrato, ya que existen formas de esta enzima que se ven diferentemente afectadas ante situaciones fisiológicas en donde se observa la acumulación de sacarosa (Doehlert y Huber, 1983; Stitt, 1988). La modificación de la actividad SPS parece estar regulada por fosforilación. Se han determinado las condiciones de medición de actividad para concentraciones de sustrato limitante sólo para las SPS de espinaca y arroz (Doehlert y Huber, 1983, 1984; Pagnussat y col., 1999) y se ha observado que éstas son especie-específicas. Las condiciones de medición de la actividad SPS en las especies de *Bromus* no han sido aún determinadas. Los ensayos en los experimentos presentados han sido medidos en condiciones de  $V_{m\acute{a}x}$ . Mediciones de SPS en condiciones limitantes de sustrato utilizando las condiciones encontradas para arroz (Pagnussat y col., 1999) no han dado tampoco diferencias significativas entre las plantas tratadas y las control.

Estudios sobre la regulación diferencial de las actividades de síntesis y clivaje de la SS apoyaron la idea de la existencia de dos formas distintas de la SS (Pontis y Wolosiuk, 1972; Pontis y col., 1981; Pontis y Salerno, 1982). Recientemente se ha propuesto que la SS de maíz también podría regularse por fosforilación, la cual modificaría diferencialmente las actividades de síntesis y clivaje de sacarosa (Huber y col., 1996), aunque estos resultados han sido cuestionados.

El aumento en el contenido de sacarosa observado en las plantas expuestas a frío podría atribuirse también a otros procesos relacionados al transporte y utilización de sacarosa, además de cambios en las actividades de las enzimas.

Por otra parte, en el presente estudio, se observaron diferencias importantes en el contenido de sacarosa entre los vástagos de ambas especies de *Bromus*, tanto en

condiciones control como en plantas tratadas con bajas temperaturas (Figura 8). Estas diferencias podrían deberse a las altas actividades SS e INV observadas en la especie del norte, con respecto a lo encontrado en los extractos de la especie patagónica (Tabla 7).

### 2.3 – Análisis del metabolismo de fructanos

La síntesis de fructanos en plantas depende de la actividad de fructosil transferasas. Las actividades SST son las responsables de incorporar nuevos residuos de fructosa usando sacarosa como único sustrato.

El comportamiento del metabolismo de fructanos en los vástagos de plantas de *B. auleticus* y *B. pictus* expuestas a bajas temperaturas es apreciablemente diferente. La actividad SST en la especie patagónica mostró un aumento de más de dos veces en su actividad durante el primer día de frío y continuó creciendo durante todo el período a 4°C ensayado (Figura 24). Este aumento de actividad se podría relacionar con el importante aumento en el nivel de sacarosa observado durante el tratamiento (Figura 8 y 13). El incremento de la actividad SST aumentó la concentración de trisacárido en los vástagos expuestos a bajas temperaturas.

En vástagos de plantas de *B. auleticus* tratadas a 4°C la actividad SST mostró un pico de actividad luego de cuatro días de tratamiento, pero volvió a decaer al nivel de los controles en el último día de frío ensayado (Figura 23). Los niveles de sacarosa y trisacárido también acompañaron este pico de actividad (Figura 8), pero fueron sensiblemente menores a los observados en la especie patagónica.

La acumulación de sacarosa y trisacárido podría ser importante en la adquisición de tolerancia a bajas temperaturas en *B. pictus*, ya que estos hidratos de carbono solubles podrían tener funciones protectoras de biomembranas y macromoléculas durante la exposición a estrés.



### 3 – Estudios del metabolismo de sacarosa y fructanos en plantas de *Bromus auleticus* y *Bromus pictus* sometidas a estrés hídrico

Durante su ciclo de vida las plantas de la especie *B. pictus* están expuestas a condiciones extremas de déficit hídrico, además del estrés por bajas temperaturas. Soriano y col. han estudiado la ecofisiología de esta especie y han registrando parámetros físicos de la meseta semiárida patagónica, ambiente de donde *B. pictus* es nativa. Durante septiembre de 1980 y junio de 1981 determinaron en la zona de Río Mayo, Chubut, el potencial agua del suelo llegando a encontrarse un potencial agua de  $-8$  Mpa en el mes de enero (Soriano y Sala, 1986).

Para ensayar estrés por déficit hídrico en el laboratorio, plantas de *B. auleticus* y *B. pictus* se regaron con soluciones crecientes de PEG 8.000. Leone y col. (1994) demostraron en cultivo de células de tomate, que la exposición a concentraciones graduales y crecientes de PEG 8.000 evitan la muerte celular y modificaciones dramáticas de los patrones de proteínas observadas cuando se expone a los tejidos, en forma directa, a concentraciones altas de PEG 8.000. El incremento gradual del déficit hídrico dispara respuestas adaptativas tendientes a evadir estos efectos indeseables del tratamiento de sequía, por lo que se utilizó esta estrategia para imponer sequía a las plantas de *Bromus* estudiadas. Según la curva obtenida del potencial agua de las soluciones de PEG 8.000 utilizadas (Figura 18), el tratamiento se encuentra muy por debajo de las condiciones hídricas de extrema sequía del suelo de la región de distribución de la especie patagónica y correspondería a un estrés leve para *B. pictus*. Sin embargo las plantas de ambas especies mostraron una reducción importante en el CRA de hojas de plantas sometidas a la máxima concentración de PEG 8.000 (Tabla 6). *B. auleticus* mostró una mortalidad celular elevada en los ápices de las raíces expuestas a estas condiciones de estrés hídrico. El 95% de los ápices de estas plantas mostraron células muertas cuando se utilizaron moléculas fluorescentes como indicadores de mortalidad celular (Figura 25). El uso

de estas moléculas fluorescentes para el ensayo de viabilidad celular ya se ha reportado anteriormente (Krishan, 1976; Jones y Senft, 1985). Las plantas de *B. pictus* tratadas con iguales condiciones de estrés mostraron el 50% de ápices con células viables.

No se observaron diferencias en los patrones de fructo-oligosacáridos de ninguna de las dos especies (Figuras 8 y 20 a 22), ni alteraciones en las actividades de las enzimas del metabolismo de sacarosa y fructanos. Estos resultados podrían indicar que el mayor contenido de fructanos presentes en los tejidos de las plantas de *B. pictus* en comparación con los encontrados en *B. auleticus*, les confiere la tolerancia observada en los ensayos de viabilidad. También podría sugerir que estos hidratos de carbono no intervienen en la respuesta al estrés por sequía en estas especies.

Para extraer mayores conclusiones es necesario ensayar déficit hídrico en niveles comparables a los encontrados en la Patagonia y evaluar la respuesta del metabolismo de sacarosa y fructanos en las dos especies nativas de *Bromus*.

## **4 – Estudios de la actividad sacarosa-sacarosa fructosil transferasa en *Bromus pictus***

### **4.1 – Desarrollo de un método enzimático para el ensayo de la actividad SST**

La síntesis de trisacárido en tejidos vegetales depende de actividades fructosil transferasas que usan sacarosa como único sustrato. La medición de estas actividades resulta dificultosa por la similitud estructural que existe entre sustratos y productos en esta reacción enzimática, ya que el trisacárido formado difiere de la sacarosa en un residuo de fructosa.

Para el estudio de esta actividad en extractos crudos, en este trabajo se utilizó un método radiactivo que incluye la síntesis de trisacárido a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-sacarosa, el fraccionamiento por PC de sustrato y producto y la medición del trisacárido formado en contador de centelleo. Este método consume no menos de 35 hs. hasta la cuantificación de la actividad.

Para estudiar algunas características bioquímicas de la actividad SST encontrada en vástagos de la especie patagónica es necesaria la purificación parcial de la enzima a fin de separarla de los altos niveles de actividad INV ácida encontrados en todos los tejidos vegetales. Por ese motivo, fue necesario encontrar otra metodología que se adecuara a los tiempos necesarios para el ensayo de pasos de purificación de proteínas.

Varios métodos enzimáticos (Bathia y Nandra, 1979; Shiomi e Izawa, 1980) habían intentado la cuantificación de trisacárido a través de la medición indirecta de glucosa remanente. Sin embargo la glucosa es también producida por la hidrólisis de sacarosa por parte de la INV, por lo que esta metodología no resulta conveniente. Un importante paso en los métodos de medición de actividad SST por métodos enzimáticos es la remoción de la alta concentración de sacarosa que permanece en la

mezcla de incubación. La hidrólisis de sacarosa con INV fúngicas comerciales ha sido en el pasado un método útil para la cuantificación de fructanos de alto peso molecular (Pontis, 1966), pero en el caso de Gramíneas donde la mayor parte de los fructanos existen en forma de oligosacáridos, se ha probado que estas enzimas producen altas tasas de hidrólisis en estos azúcares (ej: la fructosilsacarosa se hidroliza aproximadamente al 20% de la tasa de hidrólisis de sacarosa) (McCleary y Blakeney, 1996).

Otros métodos que utilizan cromatografías en columna (GLC y HPAEC-PAD) se han usado para el fraccionamiento de fructo-oligosacáridos (Darbyshire y Henry, 1978; Chatterton, 1989). Estos métodos permiten la separación de los distintos isómeros de trisacáridos, pero el elevado costo de estos equipamientos hace que sólo estén disponibles en muy pocos laboratorios del mundo.

McCleary y Blakeney (1996) purificaron una sacarasa que actúa sobre la sacarosa a pH 6,5 y que no hidroliza fructosilsacarosa. Esto permitió el desarrollo y puesta a punto de un procedimiento directo para la estimación del producto de la actividad SST.

El nuevo método enzimático para la determinación de actividad SST fue evaluado en extractos de varias especies de plantas que contienen fructanos (*B. pictus*, cebada, trigo, *C. intybus* y *H. tuberosus*) (Figuras 26 y 27). Se determinó su aplicabilidad y se comparó su sensibilidad y reproducibilidad con el método radiactivo antes utilizado para la medición de la actividad de dicha enzima (Tabla 8). En conclusión ambas técnicas estiman similares actividades SST, pero el tiempo empleado en la medición se redujo de 35 a 2 hs.

#### **4.2 – Purificación y medición de características bioquímicas de la actividad SST de *B. pictus***

Dada la estructura de los trisacáridos encontrados en los patrones de fructanos de las especies de *Bromus* estudiadas (Figura 16), la actividad SST medida en *B. pictus*

probablemente esté integrada por la actividad de dos enzimas. Según el modelo propuesto para la síntesis de trisacáridos en Gramíneas (Figura 4) corresponderían a la actividad 1-SST, que sintetiza 1-kestosa, y a la actividad 6-SFT que, en presencia de sacarosa como único sustrato, sintetizaría 6-kestosa. En el presente estudio las dos actividades no pudieron discriminarse por la metodología utilizada para cuantificar el trisacárido, por lo que la actividad observada fue referida como SST en su conjunto.

Con el objetivo de conseguir extractos proteicos con baja actividad INV que permitieran el estudio de algunas características bioquímicas de la actividad SST de *B. pictus*, se realizaron varios pasos de purificación en los que se siguió la actividad utilizando el nuevo método enzimático. Los mejores resultados en la separación de las actividades SST e INV se lograron utilizando un procedimiento de purificación que comprendía precipitación con sulfato de amonio (30-60%), cromatografía de intercambio aniónico en columna de DEAE-Sephacel (Figura 28) y cromatografía de interacción hidrofóbica en columna de Phenyl-Sepharose (Figura 29). Se logró purificar 15 veces la actividad de SST con respecto a la de INV, observándose pocos polipéptidos cuando la fracción proteica purificada fue sometida a SDS-PAGE y teñida con azul de Coomassie (Figura 30). Cuando se quiso reproducir este esquema de purificación a mayor escala no se logró obtener fracciones con baja actividad INV respecto de SST. Por esa razón se buscó una estrategia alternativa para medir actividad SST sin interferencia de INV. Se utilizó HCl-piridoxal como compuesto como inhibidor de INV en los medios de incubación. En los extractos de *B. pictus* se obtuvo una inhibición de la actividad INV del 83,5% con una concentración de 20 mM del inhibidor. La actividad SST también fue reducida pero en menor porcentaje (Tabla 9).

La curva de actividad SST dependiente de la concentración de sustrato (sacarosa) se realizó utilizando HCl-Piridoxal. Los resultados muestran una curva bifásica que no se satura a altas concentraciones de sacarosa, lo que sugiere la presencia simultánea de más de una enzima en la fracción proteica utilizada (Figura 31). En

concordancia con el análisis de los azúcares (Figura 16) estas podrían ser la 1-SST y la 6-SFT. La no saturación de las SST a altas concentraciones de sacarosa ya ha sido descrita en otras especies de Gramíneas (Chatterton y col., 1988; Simmen y col., 1993; Cairns y Ashton, 1994; Lüscher y Nelson, 1995). Cairns y Ashton (1994) ensayaron la actividad SST en *Lolium* con 1,5 M de sacarosa sin lograr su saturación. Sólo en el trabajo de Simmen y col. (1993) con cebada se ensayaron las actividades 1-SST y 6-SFT por separado en extractos parcialmente purificados. Ambas actividades no se saturaron a 600 mM de sacarosa, pero mostraron curvas diferentes de actividad en incubaciones con concentraciones crecientes de sacarosa. La actividad 1-SST mostró mayor actividad a concentraciones menores de sacarosa y se mantuvo lineal hasta 50 mM, mientras que la 6-SFT tuvo actividades bajas en las concentraciones menores de sacarosa pero la actividad se mantuvo lineal aún a 600 mM de sustrato. Esta característica de las SST de plantas junto con la extrema similitud de estas enzimas con las INV ácidas presentes en todos los tejidos vegetales, ha sido el mayor impedimento para dilucidar la vía de síntesis de trisacárido en plantas (Cairns y Ashton, 1991; Cairns, 1993). Las altas concentraciones de sacarosa necesarias para lograr una actividad suficiente de SST *in vitro* que justifique los niveles de fructanos encontrados *in vivo*, parecían no ajustarse a los niveles celulares de sacarosa. Sin embargo Koroleva y col. (1997, 1998) probaron recientemente en hojas de cebada expuestas a frío que las células del mesófilo y de la banda parenquimática contienen una concentración de sacarosa de hasta 200 mM durante las horas de luz. Estos resultados confirman que las condiciones de medición de la actividad SST *in vitro* en extractos proteicos de Gramíneas son similares a las encontradas *in vivo* y que la síntesis de fructanos depende íntimamente de las concentraciones de sacarosa de los tejidos.

El pH óptimo obtenido para la actividad SST de la especie patagónica fue entre 5,5 y 6. Estos mismos rangos de pH han sido encontrados en las enzimas ensayadas de diferentes especies (Chevalier y Rupp, 1993; Cairns y Ashton, 1994; Penson y Cairns, 1994; Van den Ende y col., 1996; y citas anteriores).

La localización de las enzimas de fructanos en la vacuola ha sido probada para *H. tuberosus* (Frehner y col. 1984; Darwen y John, 1989; Carpita y col., 1991) También se ha descrito la actividad FEH en la vacuola de células de cebada (Wagner y Wiemken, 1986), pero no ha sido confirmada aún en otras especies de Gramíneas. El pH óptimo ácido y la aparente glicosilación de las SST, deducida por su unión a Concanavalin A, sugiere que las SST de *B. pictus* podrían tener localización vacuolar.

Las actividades de las enzimas del metabolismo de fructanos han demostrado permanecer altas aún en condiciones de bajas temperaturas de incubación (Koops y Jonker, 1994, 1996; Van den Ende y col., 1996). Esto es particularmente importante para poder relacionar y dar un rol fisiológico *in vivo* a este metabolismo con respecto al estrés por bajas temperaturas. La actividad SST de *B. pictus* medida a 0°C retiene el 55% de la actividad con respecto a la ensayada a 30°C. Jonker y col. (1994,1996) han descrito valores inusualmente bajos de  $Q_{10}$  para las enzimas 1-SST y 1-FFT purificadas de *H. tuberosus*. Estas enzimas permanecen activas en el tubérculo durante el otoño, cuando el llenado de este órgano aún se está produciendo, y en el caso de la 1-FFT, se mantiene con altas actividades durante la dormición en los meses de invierno. Para el caso de las Gramíneas de climas templados que pueden acumular fructanos, se ha descrito que el metabolismo de estos azúcares se dispara en respuesta al frío (Levitt, 1980; Calderón y Pontis, 1985; Hendry, 1987; Pressman y col., 1989; Tognetti y col., 1989, 1990; Santoiani y col. 1993; Hendry, 1993; Spollen y Nelson, 1994; Bachman y Keller, 1995), por lo que es necesario que las enzimas de síntesis de estos polímeros de fructosa mantengan altas actividades en esas condiciones, coincidiendo con lo encontrado en la actividad SST de la especie patagónica.

## 5 – Estudios moleculares de enzimas del metabolismo de fructanos

Durante el desarrollo de los presentes estudios en las especies nativas de *Bromus*, otros grupos de investigación purificaron y caracterizaron varias enzimas y se aislaron varios genes que codifican para enzimas del metabolismo de fructanos de plantas superiores (Koops y Jonker, 1994, 1996; Sprenger y col., 1995; Van den Ende y col., 1996; Lüscher y col, 1996; Hellwege y col, 1997; van der Meer y col., 1998; Vijn y col, 1998; Rehm y col, 1998). Todas las enzimas estudiadas mostraron alta homología en las secuencias de aminoácidos entre sí y con INV ácidas de plantas, aún entre grupos taxonómicos tan distantes como las Gramíneas y las Compuestas.

Para realizar estudios moleculares de las enzimas del metabolismo de fructanos en *B. pictus* se utilizó la secuencia completa del ADNc de la 6-SFT de cebada, único gen de Gramíneas clonado hasta el presente. Hibridaciones de ADN genómico y ARN de la especie patagónica con esta sonda heteróloga mostraron la existencia de secuencias homólogas al ADNc de la 6-SFT de cebada (Figuras 31 y 32). Estas secuencias podrían entonces pertenecer a genes de enzimas del metabolismo de fructanos de *B. pictus*. Para intentar el aislamiento del ADNc de estos genes se desarrollaron dos estrategias paralelas: buscar los genes en una biblioteca de expresión y/o aislar los genes por la técnica de RT-PCR. Para ello se comenzó la construcción de una biblioteca de expresión en fagos a partir de ARN total extraído de vástagos de plantas de *B. pictus* expuestas siete días a bajas temperaturas, tiempo en el cual se habían registrado las mayores actividades SST en estos tejidos. Se realizó el escrutinio de la biblioteca de ADNc para buscar clones relacionados al metabolismo de fructanos, utilizando un fragmento del ADNc de la 6-SFT de cebada como sonda. Esta estrategia no ha dado aún resultados positivos. Por otra parte, comparando las secuencias conocidas de genes de enzimas de fructanos e INV de varias especies vegetales se diseñaron oligonucleótidos específicos en zonas altamente conservadas de estas secuencias, tanto a nivel de aminoácidos como de



nucleótidos (Figura 33). Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para el clonado de los genes del metabolismo de fructanos antes mencionados (Sprenger, 1995; Rehn y col., 1998; van der Meer y col., 1998). Con los oligonucleótidos específicos diseñados se realizaron ensayos de RT-PCR a partir de ARN de *B. pictus* de plantas expuestas a siete días de frío y se amplificaron secuencias de ADNc. Con la combinación U<sub>2</sub>L<sub>2</sub> se logró la amplificación de un fragmento de 760 pb, coincidiendo con el tamaño esperado de amplificación, tomando en cuenta las secuencias conocidas (Figura 35).

Con el objetivo de amplificar secuencias genómicas se realizaron ensayos de PCR usando ADN genómico de *B. auleticus* y *B. pictus* como templado y U<sub>2</sub>L<sub>2</sub> como oligonucleótidos específicos de secuencias de fructosil transferasas (Figura 37). Se logró la amplificación de fragmentos en ambas especies, observándose dos productos en la especie del norte y tres amplificados en la especie patagónica, de entre 1,2 – 1,4 Kb. Los dos fragmentos menores fueron amplificados en ambas especies, mientras que en *B. pictus* se observó una tercera banda de mayor tamaño. Los tamaños encontrados podrían corresponder a secuencias genómicas que contuvieran intrones intercalados entre las regiones utilizadas para diseñar los oligonucleótidos.

El producto de 760 pb obtenido por RT-PCR (BP760) a partir de vástagos de plantas de *B. pictus* expuestas a bajas temperaturas se clonó en el vector pGEMT Easy con el cual se transformaron células de *E. coli*. Los oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar el fragmento BP760 podrían lograr la amplificación de productos distintos, ya que la secuencia utilizada es común a varios genes de enzimas de fructanos e INV de plantas. Para analizar esta posibilidad se secuenciaron tres clones provenientes de la transformación con BP760 (G3, G9 y G11) con oligonucleótidos universales (T7 y SP6). No observándose diferencias en las secuencias nucleotídicas de los tres clones analizados.

El clon BP760-G11 (Figura 38) se utilizó para hibridar ADN genómico de *B. pictus* digerido con Hind III en condiciones de alta astringencia (Figura 39). La

autorradiografía reveló una banda mayoritaria de aprox. 4,5 Kb que coincide con la banda de mayor tamaño encontrada en las hibridaciones con el ADNc de la 6-SFT de cebada (Figura 31 A). Otra banda minoritaria de aprox. 3 Kb se observa también en estas autorradiografías, pero su tamaño no coincide con la segunda banda de 3,8 Kb observada en las hibridaciones con la sonda heteróloga.

Comparaciones realizadas con la secuencia deducida de aminoácidos de BP760-G11 revelaron una alta homología de secuencia con la 6-SFT de cebada y las restantes secuencias conocidas de otras enzimas del metabolismo de fructanos de mono y dicotiledóneas (Figura 40 A). El análisis de similitud entre estas secuencias separa a las enzimas de fructanos de Gramíneas en un bloque aparte de las enzimas de dicotiledóneas y de todas las enzimas del metabolismo de fructanos e INV ácidas comparadas. Las enzimas de Compuestas formaron un bloque separado, en el cual las SST y FFT se agrupan independientemente. Las INV mostraron mayor similitud entre sí y con los genes de *A. cepa* (6G-FFT y 1-SST).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que BP760 es un fragmento de ADNc de una fructosil transferasa de *B. pictus*, con lo cual se ha obtenido por primera vez un fragmento de un gen del metabolismo de fructanos de una Gramínea nativa.

# CONCLUSIONES


- ❖ Las especies *Bromus pictus* (origen patagónico) y *Bromus auleticus* (nativa del norte argentino) constituyeron un buen modelo para el estudio comparativo de respuestas y mecanismos de tolerancia a estreses ambientales a través de los metabolismos de sacarosa y fructanos. El uso de especies relacionadas, una tolerante a condiciones climáticas rigurosas y la otra nativa de regiones más benignas, permitió comparar el metabolismo de azúcares y sugerir que las diferencias encontradas a nivel metabólico tienen implicancias en la tolerancia.
- ❖ Los azúcares solubles como sacarosa, fructanos y rafinosa son hidratos de carbono alternativos al almidón, que tienen función de almacenamiento y podrían tener un rol de crioprotección en muchas especies de plantas de climas templados. *B. pictus* contiene altas concentraciones de fructanos en todos sus tejidos en las condiciones control de crecimiento. Las bajas temperaturas inducen un aumento en los oligosacáridos de bajo GP a expensas de los mayores, sin cambios importantes en el contenido total de fructósidos. En la especie del norte, los niveles de fructanos en plantas control son muy bajos y las bajas temperaturas inducen la síntesis de estos polímeros de fructosa. Tomando en cuenta que en la Patagonia imperan temperaturas bajas en la mayor parte de los días del año, los altos niveles constantes de fructósidos y la acumulación de oligosacáridos de bajo GP podrían conferirle a *B. pictus* una ventaja adaptativa bajo condiciones de estrés por frío. Estos azúcares solubles podrían actuar como protectores de biomembranas y macromoléculas en situaciones de estrés.

- ❖ La alta actividad SST observada en los vástagos de plantas de *B. pictus* tratadas con bajas temperaturas estuvo directamente relacionada con el aumento de la concentración de sacarosa y de trisacárido durante la exposición a 4°C. Bajo las condiciones ensayadas el aumento del nivel de sacarosa en los tejidos de ambas especies sometidas a estrés por frío no pudo explicarse por ninguna variación de las actividades de las enzimas del metabolismo de este hidrato de carbono, INV, SS y SPS. Las diferencias observadas en el nivel de sacarosa entre ambas especies podrían deberse a la mayor actividad INV y SS observada en *B. auleticus* con respecto a las actividades encontradas en *B. pictus*.
- ❖ El déficit hídrico ensayado con soluciones de PEG 8.000 en plantas de *B. auleticus* y *B. pictus* correspondió a un estrés leve, si se lo compara con las condiciones extremas de sequía que imperan en ciertos momentos del año en la estepa árida patagónica. Sin embargo, las mediciones de CRA y de viabilidad celular en ápices de raíces de ambas especies mostraron diferencias con las plantas mantenidas en condiciones normales de riego. La mortalidad celular en ápices de raíces de la especie del norte fue del 95% en las plantas tratadas siete días con las soluciones de PEG, mientras que en la especie patagónica el 50% de los ápices no mostraron células muertas. Los patrones de fructo-oligosacáridos y las enzimas medidas del metabolismo de sacarosa y fructanos, sin embargo, no mostraron cambios durante el tratamiento con déficit hídrico. Esto podría indicar que el mayor contenido de azúcares conteniendo fructosa es el responsable de la mayor tolerancia observada en *B. pictus* al tratamiento con PEG 8.000 o que estos hidratos de carbono no intervienen en la respuesta de estas plantas al estrés hídrico.

- ❖ El patrón de fructanos de ambas especies de *Bromus* contiene una amplia variedad de oligosacáridos con distintas estructuras moleculares. La serie derivada de la bifurcosa (1&6 kestotetraosa) es la más importante, con oligosacáridos compuestos por fructosas ligadas por uniones  $\beta$ -2,6 de hasta GP 16. También existe una serie minoritaria, formada probablemente por fructanos de la serie de las inulinas. Se observó la presencia de los tres isómeros posibles de trisacárido: 1-kestosa, 6-kestosa y neo-kestosa. Ambas especies contienen también rafinosa, trisacárido formado por glc, fru y gal.
- ❖ Según las actividades enzimáticas descritas hasta el presente para Gramíneas y tomando en cuenta la estructura molecular de los fructanos hallados en estas especies de *Bromus*, la vía de síntesis y degradación de estos polímeros en *B. auleticus* y *B. pictus* parece ser compleja. Se requeriría la actividad conjunta de las enzimas 1-SST, 6-SFT, 6G-FFT, 1-FFT, 1-FEH y 6-FEH para lograr los patrones de azúcares observados (ver Figura 4).
- ❖ El desarrollo de un nuevo método enzimático de medición de actividad SST permitió purificar dicha actividad en vástagos de plantas de *B. pictus* sometidas a bajas temperaturas. La metodología desarrollada tiene la sensibilidad y reproducibilidad de otros métodos utilizados para medir la actividad SST y es especialmente útil en esquemas de purificación, donde el tiempo de evaluación de la actividad se redujo 20 veces con respecto al método radiactivo antes utilizado.
- ❖ La presencia de 1-kestosa y 6-kestosa en los patrones de fructanos de la especie patagónica sugiere que la actividad SST está formada, en *B. pictus*, por la acción de dos enzimas, la 1-SST, que forma 1-kestosa y la 6-SFT, que sintetiza 6-kestosa. Los pasos de purificación ensayados no separaron dos picos de

actividad y el método enzimático utilizado para la cuantificación del trisacárido no discrimina los dos isómeros, por lo que probablemente las dos enzimas copurificaron. La actividad SST parcialmente purificada no se saturó hasta una concentración 1M de sacarosa. La curva de actividad en función de la concentración de sacarosa resultó ser bifásica, sugiriendo la presencia de más de una enzima. El pH óptimo determinado y la posible glicosilación de estas proteínas apoyan la localización vacuolar de las enzimas responsables de la síntesis de trisacárido en *B. pictus*, coincidiendo con lo propuesto hasta el presente en cuanto a las enzimas del metabolismo de fructanos en plantas.

- ❖ En *B. pictus* existen secuencias de ADN y ARN homólogas al ADNc de la 6-SFT de cebada. Mediante RT-PCR se aisló un fragmento de ADNc de 760 pb con alta homología de secuencia con la 6-SFT de cebada, otras enzimas de fructanos e INV ácidas de Gramíneas y otras monocotiledóneas. Este fragmento de ADNc correspondería a un gen de enzimas del metabolismo de fructanos y es el primero aislado de especies nativas de la Argentina.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. F. Campi'.

# **BIBLIOGRAFIA**



**ap Rees T.** – Sucrose metabolism, en “Storage carbohydrates in vascular plants” : 53-73 (Lewis D.H., ed.), Cambridge university Press, cambridge (1984).

1. **Aguilar M.R.; Soriano A.; Sala O.E.** – Competition and facilitation in the recruitment of seedlings in Patagonian steppe. *Functional Ecology* 6: 66-70 (1992).
2. **Aguilar M.R.; Sala O.E.** – Competition, facilitation, seed distribution and the origin of patches in a patagonian steppe. *OIKOS* 70: 26-34 (1994).
3. **Bachman M.; Matile P.; Keller F.** – Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. – *Plant Physiol.* 105: 1335-1345 (1994).
4. **Bachman M.; Keller F.** – Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Inter- and intracellular compartmentation. *Plant Physiol.* 109: 991-998 (1995).
5. **Bancal P.; Henson C.A.; Gaudellièr J.P.; Carpita N.C.** – Fructan chemical structure and sensitivity to an exohydrolase. *Carbohydrate Res.* 217: 137-151 (1991).
6. **Bancal P.; Triboï E.** – Temperature effect on fructan oligomer contents and fructan-related enzyme activities in stems of wheat (*Triticum aestivum* L.) during grain filling. *New Phytol.* 123: 247-253 (1993).
7. **Bender M.M.; Smith D.** -Classification of starch and fructosan-accumulating grasses as C-3 or C-4 species by carbon isotope analysis. *J. Br. Grassl. Soc.* 28: 97-100 (1973).
8. **Benhamou N.; Grenier J.; Chrispeels M.J.** – Accumulation of  $\beta$ -fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiol.* 97: 739-750 (1990).
9. **Bhatia I.S.; Nandra K.S.** – Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*. *Phytochem.* 18: 923-927 (1979).
10. **Boelcke O.** – Comunidades herbáceas del norte de la Patagonia y sus relaciones con la ganadería. *Rev. Invest Agrícolas* XI (I): 1-63 (1957).
11. **Bohnert H.J.; Nelson D.E.; Jensen R.G** - Adaptations to environmental stresses. *Plant cell* 7: 1099-1111(1995).
12. **Bonnett G.D.; Simpson R.J.** – Fructan-hydrolizing activities from *Lolium rigidum* (Gaudin). *New Phytol.* 123: 443-451 (1993).

13. **Bonnett G.D.; Simpson R.J.; Cairns A.J.** – Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytol.* 136: 11-17 (1997).
14. **Bradford M.M.** – A rapid and sensitive method for the detection of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).
15. **Bustos J.C.; Rocchi V.C.** – Caracterización termo-pluviométrica de veinte estaciones meteorológicas de Río Negro y Neuquén. Comunicación técnica N° 1, Agrometeorología, INTA-EEA-Bariloche:1-27 (1993).
16. **Caimi P.G.; McCole L.M.; Klein T.M.; Kerr P.S.** – Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens* SacB gene. *Plant Physiol.* 110: 355-363 (1996).
17. **Cairns A.J.; Ashton J.** – The interpretation of the *in vitro* measurements of fructosyl-transferase activity: An analysis of patterns of fructosyl transfer by fungal invertase. *New Phytol.* 118: 23-34 (1991).
18. **Cairns A.J.** – Evidence for *de novo* synthesis of fructan by enzymes from higher plants: A reappraisal of the 1-SST/1-FFT model. *New Phytol.* 123: 15-24 (1993).
19. **Cairns A.J.; Ashton J.** – Species-dependent patterns of fructan synthesis by enzymes from excised leaves of oat, wheat, barley and timothy. *New Phytol.* 124: 381-388 (1993).
20. **Cairns A.J.; Ashton J.** – Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. VI- Optimization and stability of enzymatic fructan synthesis. *New Phytol.* 126:3-10 (1994).
21. **Calderón P.; Pontis H.G.** – Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. *Plant Sci.* 42: 173-176 (1985).
22. **Carpita N.C.; Keller F.; Gibeaut D.M.; Housley T.L.; Matile P.** – Synthesis of inulin oligomers in tissues slices, protoplasts and intact vacuoles of Jerusalem artichoke. *J. Plant Physiol.* 138: 204- 210 (1991).
23. **Chandorkar K.; Collins F.W.** – The mechanism of the *de novo* synthesis of fructo-oligosaccharides in leaf disks of certain Asteraceae III. *Can. J. Bot.* 52: 1369-1377 (1974).

24. **Chatterton N.J.; Harrison P.A.; Bennett J.H.; Thornley W.R.** – Fructan, starch and sucrose concentrations in crested wheatgrass and redtop as affected by temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 617-623 (1987).
25. **Chatterton N.J.; Harrison P.A.; Thornley W.R.; Bennett J.H.** - Characterization of SST from crested wheat grass (*Agropyron*). *New Phytol.* 109: 29- (1988).
26. **Chatterton, N.J.; Harrison, P.A.; Benett, J.H.; Asay, K.H.** - Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 134:169-179 (1989).
27. **Chatterton N.J.; Harrison P.A.; Thornley W.R.; Bennett J.H.** – Purification and quantification of kestose (fructosylsucroses) by gel permeation and anion exchange chromatography. *Plant Physiol. Biochem.* 27:289-295 (1989).
28. **Chatterton N.J.; Thornley W.R.; Harrison P.A.; Bennett J.H.** – Fructosyltransferase and invertase activities in leaf extracts of six temperate grasses grown in warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 135: 301-305 (1989).
29. **Chatterton N.J.; Harrison P.A.; Thornley W.R.; Draper E.A.** – Oligosaccharides in foliage of *Agropyron*, *Bromus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium* and *Phleum*. *New Phytol.* 114: 167- (1990)
30. **Chatterton N.J.; Harrison P.A.; Thornley W.R.; Bennett J.H.** – Structure of fructan oligomers in cheatgrass (*Bromus tectorum* L.). *New Phytol.* 124: 389-396 (1993).
31. **Chevalier P.M.; Rupp R.A** – Inhibition of SST by cations and ionic strength. *Plant Physiol.* 101: 589-594 (1993).
32. **Chourey P.S.; Nelson O.E.** – Interallelic complementation at the *sh* locus in maize at the enzyme level. *Genetics* 91: 317-325 (1979).
33. **Concert H.J.** - Current concepts in the systematics of the Arundinoideae, en "Grass systematics and evolution" (Campbell,C.S.; Barkworht M.E., eds.) : 239-250, Washington: Smithsonian Inst. Press (1986)
34. **Correa M.N.** – *Festuca*, en "Flora Patagónica", Parte III: Gramineae, INTA 8 (3): 93-123 (1978).

35. **Cote G.L.; Ahlgren J.A.** – Metabolism in microorganisms. Part I: Levan and levansucrase, en "Science and technology of fructans" (Suzuki M; Chatterton, N.J., eds) : 142-161, CRC (1993).
36. **Crespi M.D.; Zabaleta E.J.; Pontis H.G.; Salerno G.L.** - Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* 96: 887-891 (1991).
37. **Crowe L.M.; Mouradian R.; Crowe J.H.; Jackson S.; Womersley C.** – Effects of carbohydrates on membranes stability at low water activities. *Biochim. Biophys. Acta* 769: 141-150 (1984).
38. **Crowe J.H.; Crowe L.M.** – Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 367-384 (1988).
39. **Crowe J.H.; Hoekstra F.A.; Crowe L.M.** – Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599 (1992).
40. **Darbyshire B.; Henry R.J.** – The distribution of fructans in onions. *New Phytol.* 81: 29-35 (1978).
41. **Darwen C.W.E.; John P.** – Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by ta mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol.* 89: 658-663 (1989).
42. **Dedonder R.** - Carbohydrates of the Jerusalem artichoke.I. Demonstration of a series of glucofructosans in the tuber. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34:144-182 (1952).
43. **Dedonder R.** - En "Biochemistry of glycosidic linckage" (R. Piras and H.G. Pontis, eds.): 21-78, Academic Press, New York (1972).
44. **Delauney A.J.; Verma D.P.** – Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223 (1993).
45. **Dellaporta S.L.; Wood J.; Hicks J.B.** – A plant miniprep method, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19 (1983).
46. **Doehlert D.C.; Huber S.C.** - Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiol.* 73: 989-994 (1983).
47. **Doehlert D.C.; Huber S.C.** – Phosphate inhibiton of spinach leaf sucrose phosphate synthase as affected by glucose-6-phosphate and phosphoglucoseisomerase. *Plant Physiol.* 76: 250-253 (1984).

48. **Doehlert D.C** – Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition. *Plant Sci.* 52: 153-157 (1987).
49. **Duchateau N.; Bortlik K.; Simmen U.; Wiemken A.; Bancal P.** – Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiol.* 107: 1249-1255 (1995).
50. **Dwyer P.J.; Farnden K.J.F.; Sinclair B.K.; Hurst P.L.** – Nucleotide sequence of *Asparagus acid* invertase cDNA. *J. Plant Physiol.* 114: 1568- (1997).
51. **Ebskamp M.J.N.; Van der Meer J.M.; Spronk B.A.; Weisbeek P.J.; Smeekens C.M.** – Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Bio/technology* 12: 272-275 (1994).
52. **Edelman J.** – *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52: 1737-1744 (1960).
53. **Edelman J.; Jefford, T.G.** - The metabolism of fructose polymers in plants. *Biochem. J.* 93: 148-161 (1964).
54. **Edelman J.; Dickerson A.G.** - The metabolism of fructose polymers in plants. Transfructosylation in tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochem. J.* 98: 787-794 (1966).
55. **Edelman J.; Jefford T.G.** - The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.* 67: 517-531 (1968).
56. **Equiza M.A.; Miravé J.P.; Tognetti J.A.** – Differential inhibition of shoot vs. Root growth at low temperature and its relationship with carbohydrate accumulation in different wheat cultivars. *Ann. Of Botany* 80: 657-663 (1997).
57. **Ernst M.; Chatterton N.J.; Harrison P.** – Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae. *New Phytol.* 132: 63-66 (1996).
58. **Forsyth W.G.** –Color reagents for paper chromatography of sugars. *Nature* 161: 239-240 (1948).
59. **Frehner M; Keller F.; Wiemken A.** – Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *J. Plant Physiol.* 116: 197-208 (1984).
60. **Geigenberger P.; Sttit M.** – Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189: 329-339 (1993).

61. **Goblet J.-P.; Canon L.; Van Cutsem P.J.** – *Cichorium intybus* 1-FFT cDNA. GeneBank U84398 (1997).
62. **Griffith M.; McIntyre C.H.** – The interrelationship of growth and frost tolerance in winter rye. *Physiol. Plant* 87: 335-344 (1993).
63. **Gupta A.K.; Mamta; Bhatia I.S.** - Glucofructosan metabolism in *Cichorium intybus* roots. *Phytochem.* 24: 1423-1427 (1985).
64. **Guy C. L.** - Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 185-223 (1990).
65. **Halleux S.; Van Cutsem P.** – Cloning and sequencing of the 1-SST cDNA from chicory root. *Plant Physiol.* 113: 1003 (1997).
66. **Hammer H.** - *Acta Chem. Scand.* 24: 1294-1300 (1970).
67. **Haworth W.N.; Learner A.** - Polysaccharides. Part I. The structure of inulin. *J. Chem. Soc.:* 619-625 (1928)
68. **Hellwege E.M.; Gritscher D.; Willmitzer L.; Heyer A.G.** – Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a 1-SST of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant J.* 12: 1057-1065 (1997).
69. **Hendry G.A.F.** - The ecological significance of fructan in a contemporary flora. *New Phytol.* 106 201-216 (1987).
70. **Hendry G.A.F.; Wallace R.K.** – The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans, en “Science and technology of fructans” (Suzuki M., Chatterton N.J., eds.) Ch. 4: 119-139. CRC, Florida (1993).
71. **Hendry G.A.F.** – Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123: 3-14 (1993).
72. **Henry R.J.; Darbyshire B.** – The distribution of fructan metabolizing enzymes in the onion plant. *Plant Science Letters* 14: 155-158 (1979).
73. **Henson C.A.** – Purification and properties of barley stem fructan hydrolase. *J. Plant Physiol.* 134: 186-191 (1989).
74. **Henson C.A.; Livingston III D.P.** – Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes  $\beta$ -2,6-fructans. *Plant Physiol.* 110: 639-644 (1996).

75. **Hinesley L.E.; Pharr D.M.; Snelling L.K.; Funderburk S.R.** – Foliar raffinose and sucrose in four conifer species: relationship to seasonal temperature. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117: 852-855 (1992).
76. **Hoagland D.R.; Arnon D.I.** – The water culture method of growing plants without soil. *Cal. Agr. Exp. Stn. Circular* 347 (1950).
77. **Housley T.L.; Kanabus J.; Carpita N.C.** – Fructan synthesis in wheat blades. *J. Plant Physiol.* 134: 192-195 (1989).
78. **Housley T.L.; Pollock C.J.** – The metabolism of fructan in higher plants. En "Science and technology of fructans" (Chatterton and Suzuki, eds.), CRC: 191-225 (1993)
79. **Huber J.L.; Huber S.C.; Nielsen T.H.** – *Arch. Biochem. Biophys.* 270: 681-690 (1989).
80. **Huber S.C.; Huber J.L.** – Regulation of maize leaves SPS by protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol.* 32: 319-326 (1991).
81. **Huber S.C.; Huber J.L.; Liao P.-C.; Gage D.A.; McMichael R.W.; Chourey P.S.; Hannah L.C.; Koch K.** – Phosphorylation of serine-15 of maize leaf SS. *Plant Physiol.* 112: 793-802 (1996).
82. **Hughes M.A.; Dunn M.A.** – The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47: 291-305 (1996).
83. **Huner N.P.A.; Öquist G.; Sarhan F.** – Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sc.* 3: 224-230 (1998).
84. **Isla M.I.; Salerno G.L.; Pontis H.G.; Vattuone M.M.; Sampietro A.R.** – Purification and properties of the soluble acid invertase from *Oryza sativa*. *Phytochem.* 38: 321-325 (1995).
85. **Jeong B.R.; Housley T.L.** – Purification and characterization of wheat  $\beta$ -2,1. FFT activity. *Plant Physiol.* 100: 199-204 (1992).
86. **Jones K.H.; Senft J.A.** – An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 77-79 (1985).
87. **Kandler O.; Hopf H.** – Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. En "The biochemistry of Plants", vol. 3: 221-270, Academic Press, NY (1980).

88. **Koops, A.J.; Jonker, H.H.** - Purification and characterization of enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. I-Fructan fructan fructosyltransferase. J. Exp. Botany 45: 1623-1631 (1994)
89. **Koops, A.J.; Jonker, H.H.** - Purification and characterization of enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II-Purification of 1-SST and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified 1-SST and 1-FFT. Plant Physiol. 110: 1167-1175 (1996).
90. **Koroleva O.A.; Farrar J.F.; Tomos A.D.; Pollock C.J.** - Patterns of solute in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley leaves induced to accumulate carbohydrate. New Phytol. 136: 97-104 (1997).
91. **Koroleva O.A.; Farrar J.F.; Tomos A.D.; Pollock C.J.** - Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. Plant Physiol. 118: 1525-1532 (1998).
92. **Koster K.L.; Leopold A.C.** - Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol. 88: 829-832 (1988).
93. **Krishan A.** - Rapid flow cytofluorimetric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol. 66: 188-193 (1976).
94. **Krishnan H.B.; Blanchette J.T.; Okita T.W.** - Wheat invertases. Characterization of cell wall-bound and soluble forms. Plant Physiol. 78: 241-245 (1985).
95. **Kruger N.J.** - Carbohydrate synthesis and degradation, en "Plant physiology, biochemistry and molecular biology": 59-76 (Dennis D.T., Turpin D.M., eds.), Longman, Harlow (1990).
96. **Leone A.; Costa A.; Tucci M.; Grillo S.** - Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low potential in cultured potato cells. Physiol. Plant. 92: 21-30 (1994).
97. **Levitt J.** - Responses of plants to environmental stresses. Academic Press (1972).
98. **Levitt J.** - Responses of plants to environmental stresses, Vol. I y II, Academic Press (1980).
99. **Lewis D.H.** - Nomenclature and diagramic representation of oligomeric fructans - A paper for discussion. New Phytol. 124: 583-594 (1993).



100. **Lineberger D.; Steponkus P.L.** – Cryoprotection by glucose, sucrose, and raffinose to chloroplast thylakoids. *Plant Physiol.* 65: 298-304 (1980).
101. **Livingston III D.P.; Chatterton N.J.; Harrison P.A.** – Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytol.* 123: 725-734 (1993).
102. **Livingston III D.P.; Knievel D.P.; Gildow F.E.** – Fructan synthesis in oat. I. Oligomer accumulation in stems during cold hardening and their *in vitro* synthesis in a crude enzyme extract. *New Phytol.* 127: 27-36 (1994).
103. **Lüscher, M; Frehner M.; NösbergerJ** - Purification and some properties of FFT from dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *New Phytol.* 123: 437-442 (1993).
104. **Lüscher, M; Frehner M.; NösbergerJ** - Purification and characterization of FFT from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *New Phytol.* 123:717-724 (1993).
105. **Lüscher, M; Nelson C.J.** – Fructosyltransferase activities in the leaf growth zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 107: 1419-1425 (1995).
106. **Lüscher, M; Erdin, M.; Sprenger, N.; Hochstrasser U.; Boller T.; Wiemkem A.** - Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42 (1996).
107. **Marchessault R.H.; Bleha T.; Deslandes Y.; Revol J.F.** - *Can. J. Chem.* 58: 2415-2417 (1980).
108. **McCleary ; Blakeney** - Megazyme International Ireland Ltd., Technical Bulletin OFR/96 (1996).
109. **Mc. Donald I.I.** - *Adv. Carbohydr. Chem.* 2: 253-277 (1946).
110. **McIlvaine** – *J. Biol. Chem.* 49: 183 (1921).
111. **McLeod A.M.; McCorquodale H.M.** – Water-soluble carbohydrates of seeds of the Gramineae. *New Phytol.* 57: 168-182 (1958).
112. **Mino Y.; Maeda K.** - Changes in the activities of sucrose and fructosan hydrolizing enzymes in the haplocorm of timothy plant (*Phleum pratense* L.) after cutting. *J. Jpn. Grassl. Sci.* 22: 1-6 (1976).
113. **Mitchell D.E.; Madore M.A.** – Patterns of assimilates production and translocation in muskmelon (*Cucumis melo* L.) II. Low temperature effects. *Plant Physiol.* 99: 966-971 (1992).

114. **Naranjo C.A.; Arias F.H.; Gil F.E.; Soriano A.** - *Bromus pictus* of the *B. setifolius* complex (section Pnigma): numerical taxonomy and chromosome evidence for species rank. *Can. J. Bot* 68: 2493-2500 (1990).
115. **Nelson C.J.; Spollen W.G.** - Fructans - *Physiol. Plant.* 71: 512-516 (1987).
116. **Nicora E.G.; Rúgolo de Agrasar Z.E.** - *Bromus*, en " Los géneros de gramíneas de América Austral" : 296-298, hemisferio Sur (1987).
117. **Obenland D.M.; Simmen U.; Boller T.; Wiemken A.** - Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiol.* 101: 1331-1339 (1993).
118. **Ojima, K.; Isawa, T.** - The variation of carbohydrates in various species of grasses and legumes. *Can. J.Bot.* 46: 1506-1511 (1968).
119. **Okajima H.; Smith D.** - Available carbohydrate fractions in the syem bases and seed of timothy, smooth brome grass, and several other northern grasses. *Crop Science* 4: 317-320 (1964).
120. **Olien C.R.** - Freezing stresses and survival. *Annu Rev. Plant Physiol.* 18: 387-408 (1967).
121. **Oliva G.E.; Montes L.; Mascó E.M.** - Collecting native forage germplasm in Patagonia. *Plant Genetic Resources News Letters* 93: 34-37 (1993).
122. **Oliva G.E.; Rial P.; Borrelli P.** - Desertificación y posibilidades de uso sustentable en la provincia de Santa Cruz, en "Taller Internacional de Recursos Fitogenéticos, Desertificación y Uso Susutentable" (Montes L, Oliva G.E., eds): 26-32, INTA, Santa Cruz (1994).
123. **Pagnussat G.C.; Curatti L.; Salerno G.L.** - Rice SPS: identification of an isoform specific for heterotrophic tissues with distinct metabolite regulation. *Plant Physiol.* (en prensa) (1999)
124. **Penson S.P.; Cairns A.J.** - Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparison of *de novo* synthesis *in vivo* and *in vitro*. *New Phytol.* 128: 395-402 (1994).
125. **Percheron F.** - Colorimetric determination of fructose and fructofuranosides by the thiobarbituric acid reaction. *Compt Rendus Academie du Sceances, Paris* 255: 2521-2522 (1962).

126. **Pilon-Smits E.A.H.; Ebskamp M.J.N.; Paul M.J.; Jeuken M.J.W.; Weisbeek P.J.; Smeekens C.M.** – Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant physiol.* 107: 125-130 (1995).
127. **Pollock, C.J.; Jones, T.** – Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytol.* 83:9-15 (1979).
128. **Pollock C.J.; Lloyd E.J.; Stoddard J.L.; Thomas II.** – Growth, photosynthesis and assimilate partitioning in *Lolium temulentum* exposed to chilling temperatures. *Physiol. Plant.* 59: 257-262 (1983).
129. **Pollock, C.J.** - Physiology and metabolism of sucrosyl-fructans, en "Storage carbohydrates in vascular plants" (D.H. Lewis ed.) : 97-113, Cambridge univ. Press, Cambridge (1984).
130. **Pollock, C.J.** - Environmental effects on sucrose and fructan metabolism. En "Current topics in plant biochemistry and physiol" (D.D.Randal, C.D.Miles, C.J.Nelson, D.G.Blevis, J.A. Miernik, eds), Vol.5:32-46, Univ. Missouri, Columbia (1986)
131. **Pollock C.J.; Chatterton, N.J.** - Fructans, en "The biochemistry of plants" Vol. 14 (J. Preiss ed.): Academic Press, San Diego (1988).
132. **Pollock C.J.; Cairns A.J.** – Fructan metabolism in grasses and cereals, en "Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology", Vol. 42: 77-101, Annual Reviews (1991).
133. **Pollock C.J.; Cairns A.J.; Sims I.M.; Housley T.L.** – Fructans as reserve carbohydrates in crop plants. En "Photoassimilate distribution in plants and crops source-sink relationships" (Zamski and Schaffer, eds.) Ch. 5: 97-113 (1996).
134. **Pontis, H.G.** - Observation on the *de novo* synthesis of fructosans *in vivo*. *Arch. Biopchem. Biophys.* 116: 416-423 (1966).
135. **Pontis H.G.** - Separation of fructosans by gel filtration. *Anal. Biochem* 23: 331-333 (1968).
136. **Pontis H.G.; Wolosiuk R.A.** – Studies on SS: I. Effect of trypsin on teh cleavage activity. *FEBS lett* 28: 86-88 (1972).
137. **Pontis H.G.** – Riddle of sucrose, en "Plant Biochemistry II" (D.H.Northcote, ed.) Vol. 13: 79-117, University Park Press Baltimore (1977).

138. **Pontis H.G.; Babio J.R.; Salerno G.L.** – Reversible unidirectional inhibition of SS by sulfides. P.N.A.S. 78: 6667-6669 (1981).
139. **Pontis H.G.; Salerno G.L.** – Inhibition of SS cleavage activity by protein factors. FEBS Lett 141: 120-123 (1982).
140. **Pontis H.G.; Del Campillo E.** – Fructans. En “ Biochemistry of storage carbohydrates in green plants” ch. 5: 205-227, Academic Press (1985).
141. **Pontis H.G.** – Fructans and cold stress. J. Plant Physiol. 134: 148-150 (1989).
142. **Pontis H.G.** – Fructans, en “Methods in plant biochemistry” Vol.2: 353-369, Academic Press (1990).
143. **Pontis H.G.** – A discussion on the present model of fructan biosynthesis, en “Current Topics in Plant Physiology: Sucrose metabolism, biochemistry, physiology and molecular biology” (H.G.Pontis, G.L.Salerno, E.J.Echeverría, eds.) Vol.14: 190-197 (1995).
144. **Preiss J.; Levi C.** - Starch biosynthesis and degradation. En "Biochemistry of plants" V. 3 Carbohydrates: structure and function ( J. Preiss ed.): 371-423, Academic Press, New York (1980).
145. **Pressman E.; Schaffer A.A.; Compton D.; Zamski E.** – The effect of low temperature and drought on the carbohydrate content of asparagus. J. Plant Physiol. 134: 214-217 (1989).
146. **Prud'homme M.P.; Gastal F.; Belanger G.; Boucaud J.** – Temperature effects on partitioning of <sup>14</sup>C assimilates in tall fescue (*Festuca arundinaceae* Schreb.). New Phytol. 123: 255-261 (1993).
147. **Rehm J.; Willmitzer L.; Heyer A.G.** – Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. J. Bacteriol. 180: 1305-1310 (1998).
148. **Robson, M.J; Jewiss, O.R.** - A comparison of British and North African varieties of tall fescue (*Festuca arundinaceae*). II - Growth during winter and survival at low temperatures. J. Appl. Ecol. 5: 179-190 (1968).
149. **Röber M.; Geider K.; Müller-Röber B.; Willmitzer L.** – Synthesis of fructans in tubers of transgenic starch-deficient potato plants does not result in an increased allocation of carbohydrates. Planta 199: 528-536 (1996).

150. **Rutherford P.P.; Deacon A.C.** -  $\beta$ -Fructofuranosidases from roots of dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *Biochem J.* 126: 569-573 (1972).
151. **Salerno G.L.; Ianiro, J.L.; Tognetti, J.A.; Crespi, M.D.; Pontis H.G.** - Differential induction of sucrose metabolizing enzymes in wheat (*Triticum aestivum* cv. San Agustín) leaf sections. *J. Plant Physiol.* 134: 214-217 (1989).
152. **Salerno G.L.; Pontis H.G.** - Raffinose synthesis in *Chlorella vulgaris* cultures after a cold shock. *Plant Physiol.* 89: 648-651 (1989).
153. **Salisbury F.B.; Ross C.W.** - En "Plant Physiology", Wadsworth (1992).
154. **Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T.** - Molecular cloning- Laboratory manual, CSII (1989).
155. **Sanger, Nicklen, Coulson** - *P.N.A.S.* 74: 5463-5467 (1977).
156. **Santoiani C.S.; Tognetti J.A. ; Pontis H.G.; Salerno G.L.** - Sucrose and fructan metabolism in wheat roots at chilling temperatures. *Physiol. Plant* 87: 84-88 (1993).
157. **Satyanarayana M.N.** - Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz*: Part III- Biosynthesis of oligosaccharides. *Indian J. Biochem. Biophys.* 13: 261-265 (1976).
158. **Scott R.W.; Jefford T.G.; Edelman J.** - Sucrose fructosyl transferase from higher plant tissues. *Biochem. J.* 100: 23-24 (1966)
159. **Scott R.W.** - Transfructosylation in higher plants containing fructose polymers. PhD, London University (1968).
160. **Séverier R.; Hall R.D.; van der Meer I.M.; Hakkert H.J.C.; van Tunen A.J.; Koops A.J.** - High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* 16: 843-846 (1998).
161. **Shinozaki K.; Yamaguchi-Shinozaki K.** - Molecular responses to drought and cold stress. *Plant Biotechnology* (1998).
162. **Shiomi N.; Yamada J.; Izawa M.** - Isolation and identification of fructo-oligosaccharides in roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.* 40: 567-575 (1976).
163. **Shiomi N.; Yamada J.; Izawa M.** - Synthesis of several fructo-oligosaccharides by Asparagus fructosyltransferases. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2233-2244 (1979).

164. **Shiomi N.; Yamada J.; Izawa M.** - A novel pentasaccharide in the roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Agric. Biol. Chem. 43: 1375-1377 (1979).
165. **Shiomi N.; Izawa M.** – Purification and characterization of SST from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis*). Agric. Biol. Chem. 44:603-614 (1980).
166. **Shiomi N.** - Two novel hexasaccharides from the roots of *Asparagus officinalis*. Phytochemistry 20: 2581-2583 (1981).
167. **Shiomi N.** – Purification and characterization of 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis*). Carbohydrate Res. 96: 281-292 (1981).
168. **Shiomi N.** - Purification and characterization of 1<sup>F</sup>-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis*). Carbohydrate Res. 99: 157-169 (1982).
169. **Shiomi N.** – Carbohydrate Res. 106: 166-169 (1982).
170. **Shiomi N.; Kido H.; Kiriya S.** – Purification and properties of SST in onion seeds. Phytochem. 24: 695-698 (1985).
171. **Shiomi, N.** - Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. J. Plant Physiology 134: 151 (1989).
172. **Siegl G.; Mackintosh C.; Stitt M.** – FEBS Lett. 270: 198-202 (1991).
173. **Simmen U; Obenland D.; Boller T.; Wiemken A.** – Fructan synthesis in excised barley leaves. Identification of two SST induced by light and their separation from constitutive invertases. Plant Physiol. 101: 459-468 (1993).
174. **Simpson R.J.; Walker R.P.; Pollock C.J.** – Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L.. New Phytol. 119:527-536 (1991).
175. **Simpson R.J.; Bonnett G.D.** – Fructan exohydrolase from grasses. New Phytol. 123: 453-469 (1993).
176. **Singh R.; Bhatia I.S.** - Isolation and characterization of fructosyltransferase from chicory roots. Phytochemistry 10: 495-502 (1971).
177. **Smith, D.** - Classification of several native North American grasses as starch or fructosan accumulators in relation to taxonomy. J. Br. Grassl. Soc. 23: 306-309 (1968).
178. **Smith, D.** -The non-structural carbohydrates. In The biochemistry of herbage (G.W.Guttler, R.W.Bailey, eds.) 2: 105-155. New York : Academic(1973).

179. **Smith, A.E.** –  $\beta$ -fructofuranosidase and invertase activity in tall fescue culm bases. *J. Agric. Food Chem.* 24: 476-478 (1976).
180. **Solhaug K.A.** – Effects of photoperiod and temperature on sugars and fructans in leaf blades, leaf sheaths and stems, and roots in relation to growth of *Poa pratensis*. *Physiol. Plant.* 82: 171-178 (1991).
181. **Somlo R; Durañona C.; Ortiz R.** – Valor nutritivo de especies forrajeras patagónicas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 5: 589-605 (1985).
182. **Soriano A. Sala O.E.** – Emergence and survival of *Bromus setifolius* seedlings in different microsites of patagonian arid steppe. *Israel J. Bot.* 35: 91-100 (1986).
183. **Soriano A.; Nogués Loza M.; Burkart S.** – Plant biodiversity in the extra-andinean Patagonian: comparisons with neighbouring and related vegetation units, en “Taller Internacional de Recursos Fitogenéticos, Desertificación y Uso Susutentable” (Montes L, Oliva G.E., eds): 36-44, INTA, Santa Cruz (1994).
184. **Spiro R.G.** – Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods in Enzymology* 8: 3-26 (1966).
185. **Spollen W.G.; Nelson C.J.** – Response of fructan to water déficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiol.* 106: 329-336 (1994).
186. **Sprenger N.; Bortlik K.; Brandt A.; Boller T; Wiemken A.** – Purification, cloning, and functional expression of 6-SFT, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *P.N.A.S.* 92: 11652-11656 (1995).
187. **Sprenger N.; Schellenbaum L.; van Dum K.; Boller T.; Wiemken A.** – Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley 6-SFT. *FEBS Lett.* 400: 355-358 (1996).
188. **Srepeš; Mijatovic** – *Acta Pharm. Jugosl.* 25: 189-191 (1975).
189. **St John, A.; Bonnett, G.D.; Simpson R.J.; Tanner, G.J.** -A fructan:fructan fructosyltransferase activity from *Lolium rigidum*. *New Phytol.* 135: 235-247 (1997).
190. **Stitt M.; Steup M.** – Starch and sucrose degradation, en “Enciclopedia of plant physiol.”N.S., vol. 18: 347-390 (Douce R.,Day D.A., eds.)Springer, Heidelberg (1985).

191. **Stitt M.** – Limitation of photosynthesis by sucrose synthesis. En “Progress in Photosynthesis Research” (Biggins ed.) vol. 13: : 685-692, Martinus Nijhoff (1987).
192. **Stitt, M.; Wilke, I.; Feil R.; Heldt H.W.** - Coarse control os sucrose-phosphate synthase in lives:alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. *Planta* 174: 217-230 (1988).
193. **Sturm A.; Chrispeels M.J.** – cDNA cloning of carrot extracellular  $\beta$ -fructosidase and its expressionin response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2: 1107-1119 (1991).
194. **Sun W.Q.; Irving T.C.; Leopold A.C.** – The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol. Plant.* 90: 621-628 (1994).
195. **Sutka J.; Veisz O.** - Reversal of dominance in a gene on chromosome 5A controlling frost resistance in wheat. *Genome* 30: 313-317 (1988).
196. **Suzuki M.** – Fructans in forage grasses with varying degrees of coldhardiness. *J. Plant Physiol.* 134: 224-231 (1989).
197. **Tognetti J.A.; Calderón P.L.; Pontis H.G.** – Fructan metabolism: reversal of cold acclimation. *J. Plant Physiol.* 134: 232-236 (1989).
198. **Tognetti, J.A.; Salerno, G.L.; Crespi, M.D.; Pontis, H.G.** - Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiol. Plant.* 78: 554-559 (1990).
199. **Tognetti J.A.; Salerno G.L.** - Las plantas y el frío. *Ciencia Hoy* 5 (28): 34-42 (1995).
200. **Tomashow M.F.** - Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Genet.*28: 98-131 (1990).
201. **Tsusué Y.; Fujita Y.** – Mono- and oligo-saccharides in the blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. *J.Gen. Appl. Microbiol.* 10: 283-294 (1964).
202. **Turgeon R.** – The sink-source transition in leaves- *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 119-138 (1989).
203. **Van den Ende W.; Van Laere A.** – Purification and properties of an invertase with SST activity from the roots of *Cichorium intybus* L. *New phytol.* 123: 31-37 (1993).



204. **Van den Ende, W.; De Roover J.; Van Laere, A.-** *In vitro* synthesis of fructofuranosyl-only oligosaccharides from inulin and fructose by purified chicory root FFT. *Physiol. Plant.* 97: 346-352 (1996).
205. **Van den Ende W.; Van Laere A. –** *De novo* synthesis of fructans from sucrose *in vitro* by a combination of two purified enzymes (SST and FFT) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 200: 335-342.
206. **Van den Ende, W.; Van Wonterghem, D.; Dewil, E.; Verhaert, P.; De Loof A.; Van Laere, A.-** Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus*). *Physiol. Plant.* 98: 455-466 (1996).
207. **Van den Ende, W.; Van Wonterghem, D.; Verhaert, P.; Dewil, E.; Van Laere, A. -** Purification and characterization of FFT from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Planta* 199: 493-502 (1996).
208. **Van der Meer J.M.; Ebskamp M.J.N., Visser R.G.F.; Weisbeek P.J.; Smeekens S.C.M. –** Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *Plant Cell* 6: 561-570 (1994).
209. **Van der Meer I.M.; Koops A.J.; Hakkert J.C.; van Tunen A.J. –** Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *Plant J.* 15: 489-500 (1998).
210. **Vijn I.; van Dijken A.; Sprenger N.; van Dun K.; Weisbeek P.; Wiemken A.; Smeekens A. –** Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) 6G-FFT. *Plant J.* 11: 387-398 (1997).
211. **Vijn I.; van Dijken A.; Lüscher M.; Bos A.; Smeets E.; Weisbeek P.; Wiemken A.; Smeekens A. –** Cloning of 1-SST from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiol.* 117: 1507-1513 (1998).
212. **Wagner W.; Keller F.; Wiemken A. -** Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Zeitschrift für pflanzen physiologie* 112: 359-372 (1983).
213. **Wagner W.; Wiemken A. –** Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). *Plant Physiol.* 81: 444-447 (1986).

214. **Wagner W.; Wiemken A.** – Properties and cellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). J. Plant physiol. 123: 429-439 (1986).
215. **Wagner W.; Wiemken A.** - Enzymology of fructan synthesis in grasses. Properties of SST in barley leaves (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). Plant Physiol. 85: 706-710 (1987).
216. **Walker J.L.; Huber S.C.** – Purification and preliminary characterization of sucrose-phosphate synthase using monoclonal antibodies. Plant Physiol. 89: 518-524 (1989).
217. **Walker R.P.; Winters A.L.; Pollock C.J.** – Purification and characterization of invertases from leaves of *Lolium temulentum*. New Phytol. 133: 259-266 (1997).
218. **Wang C.; Tillberg J-E.** - Effect of N deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). Physiol. Plant 97: 339-345 (1996).
219. **Wiemken V.; Ineichen K.** – Effect of temperature and photoperiod on the raffinose content of spruce roots. Planta 190: 387-392 (1993).
220. **Wolosiuk R.A.; Pontis H.G.** – Studies in sucrose synthetase. Kinetic mechanism. Arch. Biochem Biophys. 165: 140-145 (1974).
221. **Xu J.; Pemberton G.H.; Almira E.C.; McCarty D.R.; Koch K.E.** – The *Ivr 1* gene for invertase in maize. J. Plant Physiol. 108: 1293-1294 (1995).
222. **Yamamoto S.; Mino Y.** – Partial purification and properties of phleinandase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. Plant Physiol. 78: 591-595 (1985).
223. **Yamamoto S.; Mino Y.** – Mechanism of phleinandase induction in the stem base of orchardgrass after defoliation. J. Plant physiol. 134: 258-260 (1989).
224. **Yancey P.H.; Clark M.E.; Hand S.C.; Bowlus R.D.; Somero G.N.** – Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 217: 1214-1222 (1982).

# **F I B A**

Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas  
Centro de Investigaciones Biológicas

VIEYTES 3103  
CASILLA DE CORREO 1348  
7600 MAR DEL PLATA  
ARGENTINA

TEL. (54-23) 74-8784  
TEL. (54-23) 74-8257  
TEL. (54-23) 75-7120


Mar del Plata, 5 de febrero de 1999.-

Subcomisión de Doctorado  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires


De mi mayor consideración:

Adjunto a la presente el informe final del director de la Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Licenciada Andrea Fabiana Puebla. La Tesis "Estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de fructanos en respuesta a estreses ambientales en Gramíneas nativas" fue realizada bajo la dirección del Dr. Horacio G. Pontis en el Centro de Investigaciones Biológicas de la F.I.B.A..

Sin otro particular saludo atentamente



Lic. Andrea F. Puebla



Dr. Horacio G. Pontis

# F I B A

Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas  
Centro de Investigaciones Biológicas

VIEYTES 3103  
CASILLA DE CORREO 1348  
7600 MAR DEL PLATA  
ARGENTINA

TEL. (54-23) 74-8784  
TEL. (54-23) 74-8257  
TEL. (54-23) 75-7120

## Tesis de la Licenciada Andrea F. Puebla

**Tema:** "Estudios bioquímicos y moleculares del metabolismo de fructanos en respuesta a estereses ambientales en Gramíneas nativas"

## Informe final del Director

### 1.- Análisis crítico de la labor realizada

El trabajo de la Licenciada Puebla comenzó en 1993 con la idea de usar a la flora patagónica nativa, que sufre durante su ciclo de vida períodos de sequía y bajas temperaturas, como modelo experimental para estudiar el rol del metabolismo de los polímeros de fructosa en la tolerancia a aquellos estreses abióticos.

El trabajo se inició con la recolección de Gramíneas nativas pertenecientes a los géneros *Agropyron*, *Festuca*, *Poa* y *Bromus* de distintas regiones de la Patagonia. Después de un análisis preliminar se prosiguió el trabajo usando solamente a *Bromus* como sistema, ya que este género presentaba la ventaja de poseer especies relacionadas en la región norte del país y por consiguiente adaptadas a un régimen hídrico y de temperaturas totalmente diferente al de las plantas patagónicas. Se utilizó a *Bromus auleticus* como especie del norte y *Bromus pictus* como modelo de especie tolerante.

Los estudios iniciales se concentraron en el análisis comparativo de los azúcares que contienen fructosa en ambas especies de *Bromus* bajo condiciones fisiológicas distintas, ensayando tratamientos de sequía y bajas temperaturas en plantas adultas de *Bromus pictus* y *Bromus auleticus*.

Además de determinar los niveles de hidratos de carbono presentes en las plantas, se midieron las actividades de diversas enzimas relacionadas con el metabolismo de sacarosa y fructanos en general.

Completando este estudio se han realizado numerosos experimentos destinados a purificar la SST de *Bromus pictus*. Para ello se desarrolló un método original para la determinación de esta enzima, de manera que es ahora factible poder seguir la actividad de la misma en tiempos compatibles con la purificación de proteínas.

Al mismo tiempo se ensayaron técnicas para separar los distintos oligosacáridos de la serie de fructanos de la especie patagónica, utilizando para ello un tamiz molecular adecuado, con el objeto de analizar los patrones de azúcares encontrados.

En el final de esta etapa también se procedió a realizar estudios de viabilidad celular para poder determinar el daño en los tejidos de ambas especies, causado por los tratamientos ensayados.

En una segunda etapa se ha estado estudiando a *Bromus pictus* a nivel molecular, realizando análisis de los genes del metabolismo de fructanos. Con este objetivo se solicitó y se obtuvo de investigadores suizos la cesión de un clon correspondiente al cDNA de la enzima 6-SFT de cebada, única secuencia clonada del metabolismo de

# F I B A

Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas  
Centro de Investigaciones Biológicas

fructanos de Gramíneas. Este clon se utilizó como herramienta para intentar el aislamiento de genes del metabolismo de los polímeros de fructosa de *Bromus pictus*.

Para este trabajo se construyó una biblioteca de cDNA, o sea una biblioteca de expresión, que permitiera el aislamiento de los clones buscados. Paralelamente se realizaron ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos específicos.

Con respecto a su desempeño durante estos años, la Licenciada Puebla demostró un gran entusiasmo por su trabajo, al cual aportó inteligencia, perseverancia y una gran dedicación. Al mismo tiempo se mantuvo al día con todos los trabajos que fueron apareciendo en la literatura sobre su tema. Su dedicación le ha permitido publicar un trabajo en una revista internacional de reconocido prestigio y someter otro para su publicación. Durante este tiempo ha comunicado los resultados parciales que ha ido obteniendo en distintas reuniones nacionales e internacionales

## 2.- Resultados obtenidos

Los experimentos realizados con las distintas especies de *Bromus* han podido demostrar que los polímeros de fructosa en la especie patagónica (*Bromus pictus*) son expresados en forma continua y por consiguiente se puede decir que son de naturaleza constitutiva en esta especie, tanto bajo condiciones normales de temperatura y riego, como bajo fenómenos de bajas temperaturas y déficit hídrico. Por el contrario, los polímeros que aparecen en *Bromus auleticus*, especie del norte, sólo lo hacen cuando la planta es sometida a bajas temperaturas. Sin embargo, no existe diferencias cualitativas apreciables entre los distintos polímeros que se observan en ambas especies.

A nivel enzimático sucede algo semejante, sin embargo la actividad de la SST presente en *Bromus pictus* tiende a aumentar en forma continua, mientras que en la especie del norte baja, después de haber mostrado un pico de actividad en los primeros días de tratamiento.

Una observación muy importante relacionada con la viabilidad de los tejidos de ambas especies, se pudo efectuar usando colorantes fluorescentes que permitieron mostrar que las raíces de *Bromus pictus* toleraban en alto grado el déficit hídrico, mientras que las de *Bromus auleticus* sufrían un fuerte daño. Estos resultados parecen indicar que la aparente presencia constitutiva de los polímeros de fructosa en la especie patagónica le confiere la tolerancia observada.

Los resultados obtenidos en cuanto a la purificación parcial de la enzima SST sugieren una gran semejanza de las enzimas del metabolismo de fructanos con las invertasas ácidas de plantas. Las características bioquímicas encontradas en la SST de *Bromus pictus* fueron similares a las de otras especies vegetales, sugiriendo una localización vacuolar de la misma.

Debe destacarse que los estudios realizados en las plantas nativas de la Patagonia en cuanto a la presencia de polímeros de fructosa, su relación con fenómenos ambientales y su tolerancia a los mismos, no han sido hasta la fecha descriptos. Además es importante mencionar que el método analítico desarrollado, a que se hace

# **F I B A**

Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas  
Centro de Investigaciones Biológicas


referencia más arriba, es también el primero en el cual se pueden determinar en forma específica, sin interferencia, el trisacárido, producto de la reacción de la SST.

El clonado de fragmentos correspondientes a genes de enzimas del metabolismo de fructanos nos permitió compararlos con otros aislados de otras especies vegetales y nos provee una herramienta fundamental para clonar los genes completos de estas enzimas.

Finalmente, este trabajo incluye el primer informe de la construcción de una biblioteca de cDNA en plantas nativas argentinas.

### 3.- Grado de participación en las publicaciones

Cabe destacarse que en cuanto a las comunicaciones nacionales e internacionales y a las publicaciones realizadas, la Licenciada Puebla ha tenido en ellas un rol fundamental.

  
Dr. Horacio G. Pontis

Sucrose-Sucrose Fructosyl Transferase Activity: a Direct and Rapid Colorimetric Procedure for the Assay in Plant Extracts

Andrea F. Puebla<sup>1</sup>, Marina E. Battaglia, Graciela L. Salerno and Horacio G. Pontis<sup>2</sup>

Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA – PROBIOP – CONICET, Vieytes 3103, 7600 Mar del Plata, Argentina

Running title: Assay of sucrose-sucrose fructosyltransferase in plant extracts

<sup>1</sup>Submitted to fulfill in part the requirements for a doctorate at the University of Buenos Aires

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed at Centro de Investigaciones Biológicas, Casilla de Correo 1348, 7600 Mar del Plata, Argentina. Fax: 54 23 75 7120. E-mail: pontis@mdq.com.ar

## ABSTRACT

A new method is described that allows the quantification in plant extracts of the activity of the enzyme that initiates fructan biosynthesis, sucrose-sucrose fructosyl transferase (sucrose-sucrose fructosyl transferase, EC. 2.4.1.99). The procedure is based in the use of a sucrase that does not hydrolyse the reaction product, fructosylsucrose. Thus, it allows the destruction of unreacted sucrose by converting it into monosaccharides, permitting the direct colorimetric estimation of fructosylsucrose. This method is as sensitive and reproducible as a radioactive method and is faster than any of the conventional procedures, well suited for systematic and screening analysis of plant material as well as for following enzyme purification.



## KEY WORDS

Sucrose-Sucrose Fructosyltransferase, SST, Fructans, Sucrase, Fructosylsucrose, TBA method.

## ABREVIATIONS

SST: sucrose-sucrose fructosyltransferase

TBA: thiobarbituric acid

## INTRODUCTION

Fructans are polymers of fructose carrying a D-glucosyl residue at the end of the chain attached via a  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1)-linkage as in sucrose. They constitute a series of homologous oligosaccharides which can be considered as derivatives of sucrose (Hirst, 1957). Fructans are widely distributed in the plant kingdom. They are not only present in monocotyledons and dicotyledons, but also in cyanobacteria and in green algae (Meier and Reid, 1982; Pontis and Del Campillo, 1985; Pollock, 1986). Even taking a conservative approach regarding reports on fructan presence, Hendry (1987) predicts that the species world-wide which can be expected to contain fructans is about 12% of the angiospermous flora, Compositae being the dominant family. Functionally, fructans complement or even replace starch as the principal plant storage carbohydrate. In addition, fructans may also play a role in the tolerance to drought and cold stress (Pontis, 1987; Hendry, 1993).

Plant fructan biosynthesis is synthesized via repetitive fructosyl transference (Pollock, 1986) and is initiated by the action of sucrose-sucrose fructosyltransferase (sucrose-sucrose fructosyltransferase, EC 2.4.1.99) converting two molecules of sucrose into glucose and a trisaccharide, according to the following reaction



The existing methods for measuring SST activity are based on the determination of glucose or fructosylsucrose formed. Glucose has been estimated using hexokinase, phosphoglucisomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Bhatia and Nandra, 1979; Shiomi and Izawa, 1980). However, glucose is also produced together with fructose by invertase action on sucrose, commonly present in plant extracts. Because other reactions may cause changes in the concentration of glucose or fructose, measurement

by this procedure provides only an approximate estimate of the rates of trisaccharide synthesis.

The methods available for measuring directly the trisaccharide must separate it from glucose and unreacted sucrose, and from any fructose that may have been produced.

Acid crystalline yeast invertases have been used to remove unreacted sucrose (Pontis, 1966) but it was recently proved (McCleary and Blakeney, 1996) that this type of invertases hydrolases some members of the fructan series making its use controversially.

The separation and subsequent determination of the trisaccharide may be carried out by paper chromatography (PC) (Tognetti et al, 1988), thin layer chromatography (TLC) (Wagner, 1983), gas liquid chromatography (GLC) (Darbyshire and Henry, 1978), high performance liquid chromatography (HPLC) (Frehner et al., 1984; Cairns and Pollock, 1988), and anion -exchange chromatography coupled with pulse amperometric detection (HPAEC-PAD) (Chatterton et al., 1989). The first three methods are slow, each having its own cumbersome step. The methods using columns are faster and permit also the measurement of any of the isomers of fructosylsucrose found in nature, but the equipment needed is not available in all laboratories.

We describe here a method for the assay of SST involving a sucrase that does not hydrolyse fructosylsucrose, and thus allows the destruction of the unreacted sucrose by transforming it into monosaccharides. This procedure permits the direct estimation of fructosylsucrose which is simpler and faster than any of the conventional procedures, being well suited for systematic and screening analysis of plant material as well as for following enzyme purification.

## RESULTS AND DISCUSSION

An important step in many of the methods for measuring SST activity is the removal of the large excess of the substrate sucrose that remains unreacted, that even may be a problem for some chromatographic procedures. The problem may be solved by hydrolysing sucrose with invertase and destroying the resulting glucose and fructose (or any monosaccharide present) by boiling with sodium hydroxide. Pontis (1966) reported that crystalline yeast invertase hydrolyses sucrose while acting very slowly on the lower members of the fructan series, and that this action may be rendered insignificant by careful selection of the incubation conditions. However, it has been shown recently (McCleary and Blakeney, 1996) that this is not the case, and that yeast invertase does hydrolyse fructosylsucrose, even if at approximately 20% of the rate of sucrose hydrolysis, making it unsuitable for removing unreacted sucrose in SST activity assays.

McCleary and Blakeney (1996) found a sucrase that acts on sucrose at pH 6.5 and does not hydrolyse fructosylsucrose. This allows the destruction of unreacted sucrose by its transformation into monosaccharides and the development of a procedure permitting the direct estimation of the trisaccharide.

The procedure that we have developed involves two successive incubations. In the first one glucose and fructosylsucrose are produced by the action of SST, while in the second unreacted sucrose is hydrolysed by the specific sucrase, followed by destruction of the monosaccharides by boiling with alkali. The length of the first incubation depends on SST activity. The selected time for the second one is a compromise between the amount of sucrase that may be used, and the amount of sucrose that can be hydrolysed during that time. Under the conditions selected 0.25 U of sucrase could hydrolyse up to 4  $\mu$ moles of sucrose. The second incubation may be shortened to half its time by using more sucrase. After destruction of the monosaccharides, fructosylsucrose is measured directly with the

thiobarbituric acid method. The TBA method estimates up to 25 nm of trisaccharide (50 nmoles of fructose). Thus, the procedure determines as little as 5 to 100 nmoles of fructosylsucrose without interference of the glucose present in the molecule (data not shown).

The applicability of the present method was tested by the determination of SST activity in various plant extracts. Representative results are shown in Fig. 1. The rate of production of fructosylsucrose is linear and proportional to the volume of extract used as well as to the incubation time (Fig. 1, inset). A comparison of the present procedure with the measurement of SST activity by determination of the incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]-sucrose into fructosylsucrose is presented in Table 1. Both techniques estimated a similar SST activity, but the radioactive procedure took at least 35 hs to measure fructosylsucrose against 2 hs by the present one. The differences in values obtained by both methods fall inside statistical variation.

## CONCLUSION

We described a new method for the assay of SST in plants homogenates using a sucrase for hydrolising unreacted sucrose and quantifying trisaccharide by the colorimetric method of TBA.

The method described in this work is a very sensitive and reproducible assay and is well suited for analysis of enzyme activities in crude extracts as well as in purified preparations. It is simpler and faster than other methods where every other sample must be measured successively, allowing the measuring of large numbers of samples at the same time.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Sucrase was obtained from Megazyme International Ireland, Co. Wicklow, Ireland. The enzyme solution also contains  $\beta$ -amylase (*B. cereus*), pullulanase (*K. pneumoniae*) and maltase (yeast). The sucrase reagent was prepared by dissolving the contents of one vial (50 U Sucrase) in 22 ml of 100 mM sodium maleate buffer pH 6.5. The solution is divided into aliquots of appropriate volume and store frozen in polypropylene containers until use. Thiobarbituric acid (TBA) was purified according to Waravdekar and Saslaw (1959). The TBA reagent was prepared by dissolving 342 mg of the purified chemical in 100 ml of 10 mM HCl. This solution may be kept at 4° C for at least 2 months. Prior to its utilization, TBA solution is diluted 1:1 in concentrated HCl (12 M). The TBA-HCl solution should be kept in the dark at 4° C and should be used within the day.

### Plant material

*Bromus pictus*, wheat (*Triticum aestivum*), barley (*Hordeum vulgare*), chicory (*Cichorium intybus*) and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) were grown as described by Puebla et al. (1997). Samples of roots, tubers and shoots were powdered in liquid nitrogen. The powder was extracted immediately or kept at - 80° C until it was used.

### Protein extraction

The plant powder was extracted in a buffer containing 50 mM citrate-maleate pH 5.2, 1% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> pepstatin, and 10 mM NaHSO<sub>3</sub>. Extracts were centrifuged at 20,000 x g for 30 min. The clarified supernatant was either used immediately or filtered through Sephadex G-50 columns to separate carbohydrates if the amount present in the extracts was too high.

### **Sucrose-sucrose fructosyltransferase assay**

The SST reaction mixture contains: 200 mM sucrose; 100 mM acetate buffer pH 5.2; and enzyme in a total volume of 50  $\mu$ l. Blanks had the same reaction mixture but without sucrose. Incubation was carried out at 30° C for the selected time (linearity has been checked up to 4 hs). Reaction was stopped by heating. Then, 1-20  $\mu$ l of each reaction mixture were added to tubes containing 0.25 U of sucrase, in a final volumen of 0.4 ml of 50 mM sodium maleate buffer pH 6.5, and the hydrolysis of unreacted sucrose was allowed to proceed for 1 h at 40°C. Sucrase treated samples were allowed to cool at room temperature, and aliquots were heated in a final volume of 250  $\mu$ l of 0.4 M NaOH for 10 min at 100°C. The amount of fructosylsucrose formed is determined by adding 0.6 ml of the TBA-HCl reagent, and heating for 7 min at 100°C. After cooling, the absorbance of all solutions was measured at 432 nm.

SST was also assayed by a radioactive method according to Tognetti et al. (1989).



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Drs. L. Busconi and E. Folco for critically reading the manuscript and to Ing. Agr. Clara Fernandez for purifying the thiobarbituric acid. H.G.P. and G.L.S. are Career investigators of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). A.F.P. and M.E.B. are fellows of CONICET. The financial support of CONICET (Grant 4324) is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- Bhatia, I.S., and Nandra, K.S.**, 1979. Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*. *Phytochemistry*, 18, 923-927.
- Cairns A.J. and Pollock C.J.**, 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L.. I - Chromatographic characterization of oligo fructans and their labelling patterns following  $^{14}\text{CO}_2$  feeding. *New Phytol.*, 109, 399-405.
- Chatterton N.J., Harrison P.A., Thornley N.R. and Bennett J.H.**, 1989. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 134,169-179.
- Darbyshire B. and Henry R.J.**, 1978. The distribution of fructans in onions. *New Phytol.*, 81, 29-35.
- Frehner M., Keller F., Wiemken A. and Matile Ph.**, 1984. Fructan metabolism in *Helianthus tuberosus* : compartmentation in protoplasts and vacuoles isolated from tubers. *J. Plant Physiol.*, 116, 197-208.
- Hendry, G.**, 1987. The ecological significance of fructans in a contemporary flora. *New Phytol.*, 106, 201-216.
- Hendry, G.**, 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.*, 123, 3-14.
- Hirst, E.L.**, 1957. Some aspects of the chemistry of the fructosans. *Proc. Chem. Soc.*, London, 193-204.
- Jones M.G.K., Outlaw W.H. and Lowry O.H.**, 1977. Enzymatic assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol.*, 60, 379-383.
- Lüscher M., Erdin C., Sprenger N., Hochstrasser U., Boller T. and Wiemken A.**, 1996. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyl transferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Lett.*, 385, 39-42.

- McCleary, B.V. and Blakeney, B.A.**, 1996. Technical Bulletin OFR/96. Megazyme International Ireland Ltd.
- Meier, H. and Reid, J.S.G.**, 1982. Reserve carbohydrates other than starch in higher plants. In Plant carbohydrates I. Intracellular carbohydrates, Encyclopedia of Plant Physiology, 13 A, Pirson A. and Zimmermann M.H., ed., Springer-Verlag, Berlin, 418-471.
- Pollock C.J.**, 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phytol., 104, 1-24.
- Pontis H.G.**, 1966. Observations of the *de novo* synthesis of fructosans *in vivo*. Arch. Biochem. Biophys., 116, 416-423.
- Pontis H.G. and Del Campillo E.**, 1985. Fructans. In Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, Dey P.M. and Dixon R. A., ed., Academic Press, London, 205-227.
- Pontis H.G.**, 1989. Fructans and cold stress. J. Plant Physiol., 134, 148-150.
- Puebla A.F., Salerno G.L and Pontis H.G.**, 1997. Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. New Phytol., 136, 123-129.
- Shiomi N. and Izawa M.**, 1980. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase from the roots of Asparagus (*Asparagus officinalis*). Agr. Biol. Chem., 44, 603-614.
- Tognetti J.A., Calderon P.L. and Pontis H.G.**, 1989. Fructan metabolism: reversal of cold acclimation. J. Plant Physiol., 134, 232-236.
- Van den Ende W. and Van Laere A.**, 1993. Purification and properties of an invertase with sucrose:sucrose fructosyl transferase activity from the roots of *Cichorium intybus* L. New Phytol., 123, 31-37.

**Wagner W., Keller F. and Wiemken A., 1983.** Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentalization in protoplasts and vacuoles. *Z. Pflanzenphysiol.*, 112, 359-372.

**Waravdekar V.S. and Saslaw L.D., 1959.** A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy sugars with the use of the malonaldehyde thiobarbituric acid reaction. *J. Biol. Chem.*, 234, 1945-1948.

TABLE 1

SST activity measured by colorimetric and radioactive procedures in *Bromus pictus* and *Hordeum vulgare* extracts

| Plant<br>extract | <i>Bromus pictus</i>      |             | <i>Hordeum vulgare</i> |             |
|------------------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------|
|                  | Method                    |             |                        |             |
|                  | colorimetric              | radioactive | colorimetric           | radioactive |
| μl               | fructosylsucrose (nmoles) |             |                        |             |
| 10               | 75±8                      | 87±7        | 22±3                   | 19±2        |
| 20               | 162±14                    | 148±14      | ND                     | ND          |
| 30               | 207±19                    | 183±19      | 61±8                   | 56±7        |

ND: non determined.

## Legends to figures

**FIG 1.** Effect of enzyme levels in various plant extracts on the rate of fructosylsucrose formation. ■ *Bromus pictus*, △ barley, ● wheat, ▲ chicory, □ Jerusalem artichoke. The inset shows a time curve for various plant extracts using a 30 µl alicuot. SST extraction and incubation procedures performed as described under Materials and Methods.

